

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y

Microbiología



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN  
MASIVA AL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR  
*Helicobacter pylori***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ana Blanco Suárez**

Directora

Teresa Alarcón Cavero

**Madrid, 2019**

Teresa Alarcón Cavero, Doctora en Ciencias Biológicas, Facultativo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa y Profesora Asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Aplicación de las técnicas de secuenciación masiva al estudio de la infección por *Helicobacter pylori***” realizada por Ana Blanco Suárez para optar al Grado de Doctor en Microbiología y Parasitología, ha sido desarrollada bajo mi dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Para que así conste, se expide el presente certificado.

Madrid, 14 de junio del 2019

Fdo: Dra. Teresa Alarcón Cavero

*“Estudia, mi nena, que pa ti haces”*

**Mi abuelo Raúl**

*“Al cabo, tas na casa,  
hai rixos pra empezar  
as palabras da túa xente  
desfáin a señoardá.”*

**Volviche (Xosé Miguel Suárez y Javier Tejedor)**

*"Es Madrid patria de todos  
pues en su mundo pequeño  
son hijos de igual cariño  
naturales y extranjeros"*

**Pedro Calderón de la Barca**

# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Teresa Alarcón el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias por permitirme terminarla a distancia, por poner tanto de tu parte, por tus palabras de ánimo y por ser, además de mentora, amiga.

Al Dr. Álex Mira, por acogerme en su grupo de Valencia y hacerme sentir en casa, por su entusiasmo contagioso y su sentido del humor, por todos los consejos y la ayuda a lo largo de estos años. También a la Dra. Kaisa Thorell por su ayuda y colaboración.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Princesa, por acompañarme durante los años de residencia y enseñarme mucho a nivel profesional pero más aún a nivel personal. A los tutores de residentes, los doctores Diego Domingo y Ventura Buendía, que me ayudaron a que todo esto saliera adelante. También a los residentes, no me podrían haber tocado unos compañeros mejores, con una mención especial a la Dra. Laura Llorca, una fuente de inspiración y energía inagotable, que me enseñó mucho como R mayor y más aún como persona, a María Dolores Guerrero, a quien por suerte tengo geográficamente cerca, y que me enseñó a hacer árboles filogenéticos una tarde de sábado en Berga, y a Claudio Alba, por hacer magia con Linux y compartirla con los demás.

A mis compañeras de Catlab, por acogerme tan bien y hacer que el trabajo sea divertido.

También a mis vecinos madrileños, Iván y Zalo, que fueron familia en Madrid durante varios años y a quien echo de menos cada día. Ojalá la vida os traiga cerca de nuevo.

A los Bioquímicos dispersos, por ser esas personas que hacen que me duela la tripa de tanto reír, por las palabras de ánimo, por los reencuentros navideños. Pedro,

bioquímico disperso y casi cuñado, gracias por tantas visitas aquí y allá, al final la compañía es más importante que la ciudad.

A mis amigas de toda la vida (Alicia, Bea, Dory y Mjo), por estar tan cerca estando tan lejos, por hacer malabares para verme cuando voy a Asturias, por no olvidaros nunca de mí.

A mis padres, por vuestra comprensión y vuestro altruismo, por vuestros consejos y vuestra generosidad, por no hacerme sentir jamás culpable de estar lejos, espero que sepáis lo muchísimo que os quiero. A mi tía Loly y a mi abuela Mari, por la alegría que desprenden cada vez que me ven y los abrazos que me dan de puntillas. Al resto de mis abuelos, que ya no están, pero que habrían estado orgullosos de verme aquí. En especial a mi abuelo Raúl, que me transmitió desde bien pequeña la importancia del estudio y el esfuerzo, que nos contaba que se tapaba con un saco cuando llovía para ir al colegio y que dedicó una mañana de sábado a enseñarme a hacer el número 8 de un solo trazo, como si fueran dos olas del mar. Esta tesis es para él. También a mis padrinos, a mis primas y a mi familia política, por tener siempre una palabra de aliento.

A mi pareja, Carlos, bioquímico que no se dispersó y se quedó conmigo, acompañándome en la vida, allá por donde nos va llevando. Gracias por hacerme reír cada día y por dejarme llorar cuando es necesario, por las noches en las que me ha costado conciliar el sueño y me has hecho compañía para poner mis ideas en orden. Gracias por cuidarme y quererme. Te quiero.

A todos los maestros y profesores que contribuyeron a mi educación académica. Sois la base de todo lo demás.

A todos y cada uno: GRACIAS.

# ÍNDICE

---

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	SUMMARY .....	7
3.	INTRODUCCIÓN .....	13
3.1.	Secuenciación de ácidos nucleicos .....	13
3.1.1.	Antecedentes históricos .....	13
3.1.2.	Técnicas de secuenciación masiva .....	15
3.1.3.	Análisis de los resultados.....	22
3.1.4.	Aplicaciones de la secuenciación masiva en el ámbito de la microbiología clínica.....	24
3.2.	<i>Helicobacter pylori</i> .....	25
3.2.1.	Antecedentes históricos .....	25
3.2.2.	Características microbiológicas .....	30
3.2.3.	Características genómicas .....	31
3.2.4.	Patogenia y factores de virulencia .....	32
3.2.5.	Epidemiología .....	53
3.2.6.	Manifestaciones clínicas.....	56
3.2.7.	Diagnóstico .....	63
3.2.8.	Tratamiento .....	69
3.2.9.	Detección de resistencias .....	71
3.3.	Microbioma.....	73
3.3.1.	Antecedentes históricos .....	73
3.3.2.	Conceptos básicos .....	74
3.3.3.	Generalidades sobre el microbioma humano .....	75
3.3.4.	Microbioma en la salud y la enfermedad.....	76
3.3.5.	Microbioma gástrico.....	77
3.3.6.	Estudio y análisis del microbioma .....	78
4.	OBJETIVOS .....	83
5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	87
5.1.	Selección de pacientes y muestras .....	87
5.2.	Transporte de las muestras .....	88



5.3.	Procesamiento de las muestras .....	88
5.3.1.	Test rápido de la ureasa (TRU) .....	88
5.3.2.	Histología .....	88
5.3.3.	Cultivo .....	89
5.3.4.	Estudio fenotípico de sensibilidad antimicrobiana .....	89
5.4.	Extracción de ácidos nucleicos y determinación de la concentración de ADN .....	90
5.5.	Estudio de la densidad bacteriana mediante PCR a tiempo real .....	93
5.6.	Secuenciación de alto rendimiento .....	95
5.6.1.	Secuenciación mediante MiSeq (Illumina) a partir de cepa .....	95
5.6.2.	Secuenciación mediante MiSeq (Illumina) a partir de biopsia .....	96
5.6.3.	Secuenciación mediante 454 GS FLX (Roche) a partir de biopsia .....	97
5.7.	Análisis bioinformático .....	97
5.7.1.	Análisis de los genomas completos .....	97
5.7.2.	Análisis del microbioma gástrico y actividad transcripcional .....	99
6.	RESULTADOS .....	105
6.1.	Características clínico-demográficas de los pacientes .....	105
6.2.	Sensibilidad antibiótica de las cepas secuenciadas .....	108
6.3.	Análisis de genomas completos .....	109
6.3.1.	Factores de virulencia .....	110
6.3.2.	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	121
6.3.3.	Pan-genoma y genoma <i>core</i> .....	127
6.3.4.	Árbol filogenético .....	128
6.4.	Microbioma .....	130
6.4.1.	Densidad bacteriana en función del estado de <i>H. pylori</i> .....	130
6.4.2.	Microbioma gástrico: análisis mediante MiSeq (Illumina) .....	130
6.4.3.	Microbioma gástrico: análisis mediante 454 .....	139
6.4.4.	Microbioma gástrico: análisis comparado .....	147
6.4.5.	Microbioma gástrico: microorganismos transcripcionalmente activos .....	153
7.	DISCUSIÓN .....	157
7.1.	Patrón de sensibilidad antibiótica .....	157
7.2.	Análisis de genomas completos .....	160
7.2.1.	Factores de virulencia .....	160

7.2.2. Genoma core, árbol filogenético y MLST .....	166
7.3.3. Limitaciones del estudio .....	168
7.3. Microbioma .....	169
7.3.1. Análisis del microbioma gástrico en función del estado <i>H. pylori</i> .....	169
7.3.2. Análisis del microbioma gástrico: comparativa entre dos técnicas. ....	172
7.3.3. Análisis de la actividad transcripcional.....	174
7.3.4. Limitaciones del estudio .....	175
7.4. Consideraciones finales: aplicación de NGS al estudio de la infección por <i>H. pylori</i> . .....	176
8. CONCLUSIONES.....	181
9. BIBLIOGRAFÍA .....	187

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación de las CMI's para *H. pylori* según criterios EUCAST..... 90

Tabla 2. Cebadores y volúmenes para la amplificación del gen bacteriano ARNr 16S y el gen de la actina humana. .... 94

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen bacteriano ARNr 16S..... 94

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación del gen humano de la actina. .... 95

Tabla 5. Rectas patrón para el gen bacteriano 16SARNr y el gen de la actina humana. 95

Tabla 6. Características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio. .... 105

Tabla 7. Características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de genomas de *H. pylori*. .... 106

Tabla 8. Características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de microbioma..... 106

Tabla 9. Características clínico demográficas de los pacientes..... 107

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI, ug/mL) de las cepas estudiadas para amoxicilina (AMX), claritromicina (CLA), rifampicina (RIF), levofloxacino (LEV), tetraciclina (TET) y metronidazol (MET) e interpretada según EUCAST como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R). .... 108

Tabla 11. Características de los genomas secuenciados. .... 109

Tabla 12. Presencia o ausencia de los genes que codifican para las proteínas que componen la ureasa en cada cepa de *H. pylori* estudiada..... 110

Tabla 13. Presencia o ausencia de los genes que codifican las proteínas que componen los flagelos de *H. pylori* en cada una de las cepas estudiadas. .... 111

Tabla 14. Presencia o ausencia de los genes codificantes para varias proteínas de membrana externa (OMPs) en cada una de las cepas de *H. pylori* estudiadas. En el gen oipA se indica el estado ON/OFF del gen. .... 112

Tabla 15. Resultado del análisis mediante BLAST para diferenciar las variantes *babA1* y *babA2*..... 113

Tabla 16. Presencia o ausencia de los genes codificantes para las proteínas que conforman el SST4 cagPAI en cada una de las cepas de estudiadas..... 116

Tabla 17. Presencia o ausencia de los genes que codifican para las proteínas que componen el SST4 ComB en las cepas de estudiadas. .... 118

Tabla 18. Presencia o ausencia de los genes que codifican para las proteínas que componen los SST4 tfs3 y tfs4. .... 119

Tabla 19. Resultados del análisis mediante BLAST para el gen *dupA*. .... 119

Tabla 20. Resumen de los alelos de las regiones s, m, i, d y c del gen *vacA* para cada cepa de *H. pylori*..... 120

Tabla 21. Resultados del análisis mediante BLAST para el gen *iceA*. .... 121

Tabla 22. Ratio mediano ARNr 16S/actina (RI) en función del estado *H. pylori*. .... 130

Tabla 23. Número máximo, medio y mínimo de secuencias en las 20 biopsias de antro gástrico estudiadas..... 131

Tabla 24. Índice de Shannon para cada muestra analizada y media del índice de Shannon ( $\pm$ desviación estándar, $\sigma$ ) en función del estado de <i>H. pylori</i> .	134
Tabla 25. Porcentaje de secuencias del género <i>Helicobacter</i> para cada muestra analizada.	139
Tabla 26. Número máximo, medio y mínimo de secuencias en las 20 biopsias de antro gástrico estudiadas.	139
Tabla 27. Índice de Shannon para cada muestra analizada y media del índice de Shannon ( $\pm$ desviación estándar, $\sigma$ ) en función del estado de <i>H. pylori</i> .	142
Tabla 28. Porcentaje de secuencias del género <i>Helicobacter</i> para cada muestra analizada.	147
Tabla 29. Índice de Shannon para cada muestra analizada y media del índice de Shannon ( $\pm$ desviación estándar, $\sigma$ ) en función del estado de <i>H. pylori</i> y según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq).	148
Tabla 30. p-valor obtenido al realizar análisis cualitativo y cuantitativo de beta-diversidad en función de los resultados del cultivo, hallazgos histológicos, infrapeso y sexo según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq).	149
Tabla 31. Porcentaje de secuencias del género <i>Helicobacter</i> para cada muestra analizada según el tipo de técnica utilizada (MiSeq frente a 454).	152
Tabla 32. Porcentajes medios de secuencias detectadas para los principales géneros presentes en las biopsias de antro gástrico en función del estado de <i>H. pylori</i> y el ácido nucleico de partida (ARN o ADN).	153
Tabla 33. Ratio de actividad (RA) de los diferentes géneros bacterianos según el estado de <i>H. pylori</i> .	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso realizado en las PCR en emulsión (4)..... 16

Figura 2. Proceso de PCR puente (izquierda) y “template walking” (derecha) (4). ..... 17

Figura 3. Proceso de amplificación con nanobolas de ADN en solución (4). ..... 18

Figura 4. Proceso de secuenciación con las plataformas 454 (4a) e Illumina (4b) (7)... 21

Figura 5. Esquema de la estructura flagelar de *C. jejuni* (representativa de *H. pylori*) y las cascadas que regulan su biosíntesis (68)..... 34

Figura 6. Estructura de cagPAII (80). ..... 39

Figura 7. Posibles polimorfismos del gen cagA. Los motivos EPIYA aparecen en color naranja flanqueados de verde, azul, gris y amarillo según sean EPIYA-A, -B, -C o -D, respectivamente (80). ..... 40

Figura 8. Cascada de señales provocada por la activación de la actividad fosfatasa de SHP-2 (77). ..... 41

Figura 9. Estructura y localización celular esquematizadas del SST4 de *H. pylori* (84).. 43

Figura 10. Esquema de la estructura y localización celular de comB (87). ..... 44

Figura 11. Estructura esquemática de la pro-toxina VacA y las escisiones proteolíticas que sufre para producir los dominios p33 y p55 que forman la toxina definitiva (89). 46

Figura 12. Resumen de los principales procesos de VacA: producción de vacuolas, apoptosis por liberación del citocromo c, inducción de inflamación e inhibición de la proliferación de linfocitos T (89). ..... 48

Figura 13. Estructura del gen *vacA* y los polimorfismos que pueden presentar las regiones s, i, d, m y c (93). ..... 49

Figura 14. Estructura propuesta del LPS de *H. pylori* cepa 26695 (96). ..... 52

Figura 15. Mapa mundial en el que se indican con flechas los patrones globales estimados de la migración de *H. pylori* y los años estimados desde que se produjeron. La flecha discontinua indica una migración no confirmada (83). ..... 53

Figura 16. Perfiles MLST para las cepas ES-07, ES-10, ES-11 y ES-12 de *H. pylori*. ..... 122

Figura 17. Perfil MLST para las cepas ES-13, ES-15, ES-25 y ES-26 de *H. pylori*. ..... 123

Figura 18. Perfil MLST para las cepas ES-27, ES-31, ES-46 y Es-54 de *H. pylori*. ..... 124

Figura 19. Perfil MLST para las cepas ES-58, ES-60, ES-61 y ES-68 de *H. pylori*. ..... 125

Figura 20. Perfil MLST para las cepas ES-76, ES-610, ES-DO y ES-SN de *H. pylori*. ..... 126

Figura 21. Representación del genoma *core*, genoma prescindible y genoma único con un porcentaje mínimo de identidad del 95% para las 20 cepas de *H. pylori* estudiadas. .... 127

Figura 22. Representación del genoma *core*, genoma prescindible y genoma único con un porcentaje mínimo de identidad del 95% para las 20 cepas de *H. pylori* estudiadas y las 6 cepas de referencia. .... 128

Figura 23. . Árbol filogenético. Se representan las relaciones filogenéticas entre las 20 cepas analizadas en función de su genoma *core*. Se muestran la presencia o ausencia de *cagA*, *iceA*, *babA*, *babB*, *babC* y *sabB*. También se señalan los alelos del gen *vacA*, la edad,

el índice de masa corporal (IMC), el sexo y la resistencia antibiótica (ATB) a claritromicina (Cl), metronidazol (Mz) y amoxicilina (Am).....	129
Figura 24. Curvas de rarefacción para cada muestra estudiada. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias. ....	132
Figura 25. Curvas de rarefacción. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de <i>H. pylori</i> .....	132
Figura 26. Curvas de rarefacción. Distancia filogenética (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de <i>H. pylori</i> .....	133
Figura 27. Análisis cualitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de <i>H. pylori</i> (negativo/positivo) $p=0,01$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis) $p=0,05$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso) $p=0,22$ y d) sexo (masculino/femenino) $p=0,81$ .....	135
Figura 28. Análisis cuantitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de <i>H. pylori</i> (negativo/positivo) $p=0,001$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis) $p=0,008$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso) $p=0,23$ y d) sexo (masculino/femenino) $p=0,62$ .....	137
Figura 29. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de filo en función del estado de <i>H. pylori</i> .....	138
Figura 30. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de género en función del estado de <i>H. pylori</i> .....	138
Figura 31. Curvas de rarefacción para cada muestra estudiada. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias. ....	140
Figura 32. Curvas de rarefacción. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de <i>H. pylori</i> .....	141
Figura 33. Curvas de rarefacción. Distancia filogenética (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de <i>H. pylori</i> .....	141
Figura 34. Análisis cualitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de <i>H. pylori</i> (negativo/positivo) $p=0,005$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis) $p=0,49$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso) $p=0,81$ y d) sexo (masculino/femenino) $p=0,22$ .....	143
Figura 35. Análisis cuantitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de <i>H. pylori</i> (negativo/positivo) $p=0,01$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis) $p=0,16$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso) $p=0,92$ y d) sexo (masculino/femenino) $p=0,73$ .....	145
Figura 36. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de filo en función del estado de <i>H. pylori</i> .....	146
Figura 37. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de género en función del estado de <i>H. pylori</i> .....	146
Figura 38. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de filo en función del estado de <i>H. pylori</i> y según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq).....	151

Figura 39. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de género en función del estado de *H. pylori* y según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq). ..... 151

## RESUMEN

---



## 1. RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

Las técnicas de secuenciación han evolucionado con rapidez desde su desarrollo en la década de 1970. Actualmente, las técnicas de secuenciación masiva permiten obtener millones de secuencias en poco tiempo, lo que ha permitido secuenciar genomas completos (eucariotas y procariotas) y también estudiar el microbioma humano.

El objetivo de este trabajo es explorar la aplicabilidad que las técnicas de secuenciación masiva pueden tener en el estudio de la infección por *Helicobacter pylori*, un bacilo Gram negativo microaerófilico que coloniza la mucosa gástrica humana pudiendo generar patologías como la gastritis, úlcera péptica, carcinoma gástrico y linfoma tipo MALT. El trabajo se estructura en una primera sección de secuenciación de 20 genomas de *H. pylori* con el estudio de los factores de virulencia, el tipado *in silico* de las cepas mediante estudio de MLST y estudio del pan-genoma y una segunda sección de estudio del microbioma gástrico, comparando los resultados de dos técnicas de secuenciación masiva (454 de Roche y MiSeq de Illumina) en pacientes colonizados y no colonizados por *H. pylori*, así como una aproximación a la actividad transcripcional de los microorganismos detectados.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 39 pacientes pediátricos a los que se realizó endoscopia digestiva para toma de biopsia de antro gástrico. De ellos, 28 fueron *H. pylori* positivos (cultivo de *H. pylori* a partir de biopsia positivo): 18 se incluyeron en el

estudio de genomas, 8 en el de microbioma y 2 en ambos. Los 11 restantes fueron *H. pylori* negativos (cultivo negativo de *H. pylori* a partir de biopsia y prueba de ureasa rápida negativa): todos ellos incluidos en el estudio del microbioma. Para cada cepa incluida en el estudio de genomas se realizó secuenciación de alto rendimiento del genoma completo mediante el equipo MiSeq (Illumina). Para las biopsias incluidas en el estudio del microbioma se realizó estudio de la densidad bacteriana mediante qPCR del 16S y estudio del microbioma de forma paralela mediante secuenciación del gen ARNr 16S por tecnología MiSeq (Illumina) y 454 (Roche). El estudio de la actividad transcripcional se realizó únicamente mediante tecnología MiSeq (Illumina). El análisis de resultados de los genomas secuenciados se realizó utilizando las herramientas informáticas PROKKA v1.12, virtual MLST 2.0, build\_PGAdB, build\_wgMLSTtree e iTOL. Los análisis de microbioma gástrico se llevaron a cabo utilizando la plataforma QIIME v 1.8.0 y SPSS 15.0.

## RESULTADOS

Mediante el análisis de los genomas completos se comprobó que la mayoría de cepas estudiadas presentan perfiles poco virulentos (4 de las 20 cepas eran *cagA* positivas con motivos EPIYA tipo ABC y -BC y 5 de las 20 cepas presentaron el alelo s1 de *vacA*). También se objetivó que el tipado mediante MLST no es útil en el caso de *H. pylori* y que el estudio del pan-genoma y más concretamente del genoma *core* permite apreciar relaciones filogenéticas de forma más precisa.

En el estudio del microbioma gástrico, se observó que la densidad bacteriana en las biopsias varía entre los pacientes *H. pylori* negativos y positivos, siendo mayor en los positivos. El estudio mediante secuenciación masiva puso de manifiesto diferencias

entre las dos técnicas utilizadas, principalmente a nivel de alfa diversidad, ya que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el índice de Shannon entre los pacientes *H. pylori* negativos y positivos al trabajar con tecnología MiSeq, pero no con 454. En cuanto a la beta diversidad, se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar los resultados obtenidos mediante la tecnología MiSeq y 454 en función del resultado del cultivo tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo. Al realizar el análisis en función de los hallazgos histológicos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (en el análisis cualitativo y cuantitativo) únicamente mediante tecnología MiSeq. En el análisis taxonómico a nivel de filo se observó una diferencia en el grupo *H. pylori* negativo en la abundancia relativa de los filos Proteobacteria (el más abundante por tecnología MiSeq) y Firmicutes (el más abundante por tecnología 454), pero no se observó en el grupo de *H. pylori* positivos. A nivel de género, los resultados en el grupo *H. pylori* positivos fueron similares, pero en el grupo *H. pylori* negativos, se observaron abundancias relativas entre el 2 y el 9% por tecnología MiSeq en géneros que apenas tuvieron representación por tecnología 454.

En cuanto al análisis de actividad transcripcional, los géneros *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella* y *Prevotella*, se encontraron más activos en las muestras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos, mientras que el género *Helicobacter* apareció más activo en las muestras de pacientes *H. pylori* negativos.

## CONCLUSIONES

El análisis de genomas completos permite concluir que las cepas que circulan en nuestro entorno son, en general, poco virulentas, que el genoma *core* de *H. pylori* comprende un bajo porcentaje del total de genes presentes en su cromosoma y

disminuye al incorporar cepas de diversos orígenes geográficos. Además, las cepas de *H. pylori* son genéticamente diversas y no presentan, en general, relaciones filogenéticas entre ellas.

En cuanto al estudio de las biopsias gástricas, se ha podido comprobar que la densidad bacteriana analizada mediante qPCR es diferente entre pacientes *H. pylori* positivos y *H. pylori* negativos.

El microbioma gástrico presenta diferencias entre *H. pylori* positivos y negativos en cuanto a alfa-diversidad mediante tecnología MiSeq. En cuanto a beta diversidad, existen diferencias entre pacientes *H. pylori* positivos y *H. pylori* negativos tanto en el análisis por 454 como por MiSeq y mientras que solamente se observan diferencias en función de los hallazgos histológicos en el análisis mediante MiSeq. El estudio taxonómico revela un predominio de los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria en los pacientes *H. pylori* positivos y negativos. *Helicobacter* es el género predominante en las muestras de pacientes *H. pylori* positivos y *Streptococcus* en los pacientes *H. pylori* negativos, independientemente de la plataforma de secuenciación utilizada.

El uso de diferentes protocolos de secuenciación implica diferencias en los resultados, fundamentalmente a nivel de alfa diversidad y análisis de la composición taxonómica.

Es posible detectar secuencias de ARN bacteriano en biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *H. pylori* que orientan a pensar en una comunidad bacteriana estable y activa en el estómago.

## SUMMARY

---

## 2. SUMMARY

### TITLE

Next generation sequencing techniques application to the study of *Helicobacter pylori* infection

### INTRODUCTION

Sequencing technology has rapidly evolved since its development in 1970s. Nowadays, next generation sequencing techniques allow to obtain millions of reads in short time and it has made eukaryotic and prokaryotic whole genome sequencing and human microbiome study possible.

The aim of this work is to explore the applicability that next generation sequencing techniques may have in *Helicobacter pylori* infection. *H. pylori* is a microaerophilic Gram negative bacillus that colonizes human gastric mucosa being able to produce gastritis, peptic ulcer disease, gastric carcinoma and MALT lymphoma. The work is divided in two sections. The first one consists of 20 *H. pylori* genomes sequencing, including virulence factors study and *in silico* typing of the strains through MLST and pan-genome study. The second section is dedicated to gastric microbiome study, comparing the results obtained by two different next generation sequencing platforms (454 by Roche and MiSeq by Illumina) in *H. pylori* colonized and non-colonized patients as well as an approach to the transcriptional activity of the detected microorganisms.

## MATERIALS AND METHODS

Thirty-nine paediatric patients who underwent gastric endoscopy with gastric *antrum* biopsy collection were enrolled in the study. Of them, 28 were *H. pylori* positive (positive *H. pylori* biopsy culture): 18 of them were enrolled in the genomes study, 8 of them in the microbiome study and the other 2 took part in both studies. The remaining 11 were *H. pylori* negative (negative *H. pylori* biopsy culture and negative urease rapid test): all of them were included in the microbiome study. For each strain included in the genomes study, next generation sequencing of whole genome using MiSeq (Illumina) was performed. For the biopsies included in the microbiome study, bacterial density was analysed by performing 16S rRNA qPCR and a parallel microbiome study was carried out by 16S rRNA sequencing using MiSeq (Illumina) and 454 (Roche) technologies. Transcriptional activity analysis was performed using MiSeq (Illumina). Genomes data analysis was performed using the bioinformatic tools PROKKA v1.12, virtual MLST 2.0, build\_PGAdB, build\_wgMLSTtree and iTOL. Microbiome data analysis was performed using QIIME v 1.8.0 platform and SPSS 15.0 software.

## RESULTS

Through whole genome sequencing analysis, it was confirmed that the majority of studied strains had low virulence profiles (4 of the 20 strains were *cagA* positive and carried EPIYA-ABC and -BC motifs and 5 of 20 strains carried s1 *vacA* allele). It was also verified that MLST typing is not useful for *H. pylori* and that pan-genome and, more specifically, core-genome study allows more accurate observation of phylogenetic relations.

Through gastric microbiome study, it was observed that biopsies' bacterial density was different between positive and negative *H. pylori* patients, being higher in the positive group. Next generation sequencing study showed differences between the two techniques used, mainly at alpha-diversity level, since statistically significant differences in Shannon index between positive and negative *H. pylori* patients were obtained when using MiSeq but not 454 technology. Regarding beta-diversity, statistically significant differences were obtained according to positive or negative *H. pylori* status using both MiSeq and 454 and both in weight and unweight analysis. When analysing beta-diversity according to histological findings, only MiSeq showed statistically significant differences (in both weight and unweight analysis). The taxonomic analysis at phylum level showed differences in relative abundance in the negative *H. pylori* group, since according to MiSeq, Proteobacteria was the most abundant phylum and, according 454, it was Firmicutes. This difference was not observed in positive *H. pylori* group. At genus level, results were comparable in the positive *H. pylori* group. On the contrary, the *H. pylori* negative group showed some genus at 2-9% of relative abundance when using MiSeq technology that were scarcely present in 454 analysis.

According to transcriptional activity analysis, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella* and *Prevotella* genera were more active in biopsies from positive *H. pylori* patients and *Helicobacter* genus was more active in biopsies from negative *H. pylori* patients.



## CONCLUSIONS

Whole genome sequencing analysis allows to conclude that strains present in our environment are, in general, fairly virulent and also that *H. pylori* core-genome involves a low percentage of the total of genes present in its chromosome and decreases when adding strains from other geographic origins. Besides, *H. pylori* strains are genetically diverse and do not show, in general, phylogenetic relations among them.

As for the biopsies study, it has been showed that qPCR-based bacterial load analysis is different between positive and negative *H. pylori* patients.

Gastric microbiome shows differences between positive and negative *H. pylori* patients regarding alpha-diversity when using MiSeq. Beta-diversity is different between positive and negative *H. pylori* patients when using both MiSeq and 454 technologies, but differences based on histological findings are only observed when using MiSeq. Taxonomic analysis reveals a predominance of Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria phyla in both positive and negative *H. pylori* patients. The most predominante genera is *Helicobacter* in positive *H. pylori* patients and *Streptococcus* in negative *H. pylori* ones, regardless of the next generation sequencing platform used.

The usage of different sequencing protocols involves differences in results, mainly at alpha-diversity level and also in taxonomic composition analysis.

It is possible to detect bacterial RNA sequences in gastric biopsies from both patients with and without *H. pylori* infection, which points to a stable and active bacterial community in the stomach.

# INTRODUCCIÓN

---

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Secuenciación de ácidos nucleicos

##### 3.1.1. Antecedentes históricos

La secuenciación de ácidos nucleicos es el método por el cual se llega a conocer el orden de bases nitrogenadas (adenina, timina, guanosina, citosina y uracilo) en una molécula de ácido ribonucleído (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN).

Tuvo que pasar más de un siglo desde que en 1869, el biólogo y médico suizo Fiedrich Miescher, aislase por primera vez moléculas de ácidos nucleicos (que él denominó “nucleína”) hasta que en 1976 Allan Maxam y Walter Gilbert desarrollasen la primera técnica de secuenciación (1).

Durante ese tiempo hubo importantes avances que fueron la base para el inicio de las técnicas de secuenciación (2):

- se acuñó el término ácidos nucleicos (Richard Altman, 1889),
- se descubrieron las bases nitrogenadas (Albrecht Kossel) y se identificaron (Phoebus Aaron, Theodore Levene),
- se caracterizaron el ADN y el ARN (Theodore Levene, 1909),
- comenzaron los primeros estudios sobre su estructura (William Astbury, M. Gulland y D.O. Jordan, 1938),
- se descubrió que la información genética reside en el ADN (Fred Griffith, Oswald Avery, Colin McLeod y Maclyn McCarthy, 1944),
- se enunciaron las reglas de Chargaff (Erwin Chargaff, 1950) y

- se llegó a conocer definitivamente la estructura del ADN (gracias a los trabajos de Rosalind Elsie Franklin y Maurice Hugh Frederick Wilkins), publicada en 1953 (James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick).
- En 1960 se descubrió la enzima ADN polimerasa (Arthur Kornberg).

La técnica desarrollada por Maxam y Gilbert permitía la lectura de unos 100 nucleótidos, estaba basada en la digestión química y se conoce también como secuenciación por “punto corrido”. La complejidad técnica y el uso de sustancias radiactivas, provocó que fuera desplazada por la técnica desarrollada por Frederick Sanger en 1975, conocida como el método de los dideoxinucleótidos o terminación de la cadena y basada en el proceso de replicación natural de los ácidos nucleicos. Esta técnica, posteriormente automatizada por Leroy Hood, Michael Hunkapiller y Lloyd Smith, permitió la comercialización en 1986 del primer secuenciador automático (Applied Biosystems 370A) que permitía obtener 200 bases por muestra y hora procedentes de hasta 96 muestras. La incorporación de la electroforesis capilar permitió mejorar los tiempos de secuenciación y comercializar el ABI PRISM 3700, que fue el secuenciador utilizado en el Proyecto Genoma Humano (1985-2003) (3). El método de secuenciación Sanger automatizada aún se utiliza hoy en día en diversos ámbitos científicos y diagnósticos.

A raíz del Proyecto Genoma Humano, que costó 2047 millones de euros y llevó más de una década de trabajo, se hizo patente la necesidad de mejorar las técnicas de secuenciación tanto en rapidez como en precio (3).

### 3.1.2. Técnicas de secuenciación masiva

Las técnicas de secuenciación masiva, ultrasecuenciación o “next generation sequencing” (NGS) nacen con la idea de optimizar las técnicas de secuenciación clásicas. La base de su fundamento es la lectura simultánea de la secuencia de muchas moléculas cortas (alrededor de 100 pares de bases) realizando todas las reacciones con las moléculas de ácidos nucleicos inmovilizadas sobre una superficie sólida, lo que permite minimizar el gasto de reactivos y abaratar la técnica. Una vez obtenidas las secuencias, estas se ensamblan bien frente a un genoma de referencia o bien “de novo” para unir las en el orden correcto.

Si bien estas plataformas aumentan enormemente la cantidad de información por unidad de tiempo, su tasa de error es también más alta (0,1-15%) que la de la secuenciación Sanger y en los equipos más extendidos y con menor coste de secuenciación, la longitud de las secuencias también es generalmente menor que en el método Sanger, oscilando entre 35 y 700pb. En base a la longitud de las moléculas que se pueden secuenciar se distinguen dos tipos de tecnologías NGS: *short-read* NGS (de lectura corta) y *long-read* NGS (de lectura larga) (4).

#### 3.1.2.1. *Short-read* NGS

##### 3.1.2.1.1. Pasos previos

Partiendo del ADN total extraído y purificado (o de un gen concreto amplificado, como podría ser el gen bacteriano ARNr 16S que se ha utilizado habitualmente en estudios de microbioma), hay dos pasos iniciales: la fragmentación del ADN junto con la unión a un adaptador y la amplificación masiva del ADN de interés mediante PCR.

- Estrategias de fragmentación (5)

- a) Mecánicas: provocan la ruptura del ADN en puntos aleatorios al someterlo a una fuerza exterior. Por ejemplo, la nebulización, que se consigue forzando el paso del ADN a través de poros mediante el uso de nitrógeno o aire comprimido, o la sonicación sometiendo al ADN a ondas ultrasónicas, que provocan la formación de burbujas de gas en la solución y rompen el ADN por resonancia.
- b) Enzimáticas: rompen el ADN en puntos aleatorios, bien por el uso de kits de enzimas de fragmentación comerciales (por ejemplo, NEB Next™, New England Biolabs, Ipswich, MA) o bien mediante “tagmentación” (Illumina) (6) en la que la trasposasa Tn5 provoca la rotura del ADN y la ligación de unos adaptadores a los fragmentos resultantes.

- Estrategias de PCR (4)

Se diferencian cuatro tipos de estrategias de PCR:

- a) PCR en emulsión: utilizada al trabajar en equipos 454 (Roche), SOLiD (Thermo Fisher), GeneReader (Qiagen) e Ion Torrent (Thermo Fisher). Los fragmentos de ADN se ligan a un adaptador y se sumergen en una solución micelar en la que se encuentran bolas recubiertas con adaptadores complementarios y los reactivos necesarios para la reacción de PCR. Tras la reacción, cada bola estará recubierta por miles de copias idénticas de ADN (figura 1).

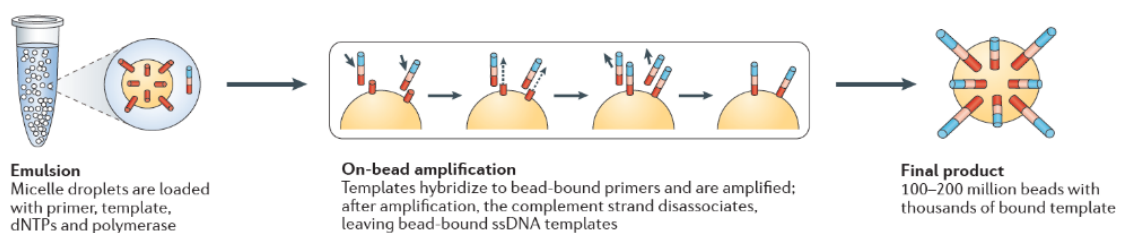


Figura 1. Proceso realizado en las PCR en emulsión (4).

- b) PCR puente en fase sólida: utilizada al trabajar con las plataformas Illumina. El ADN fragmentado se liga a secuencias adaptadoras que hibridan con los cebadores, unidos a una superficie sólida. El extremo libre del ADN puede interactuar con otros cebadores cercanos, formando una estructura en puente. La reacción de PCR amplifica la hebra complementaria en estas estructuras y uno de los extremos de ADN es liberado, permitiendo una nueva hibridación. El resultado final son grupos (“clusters”) de moléculas de ADN idénticas (figura 2).

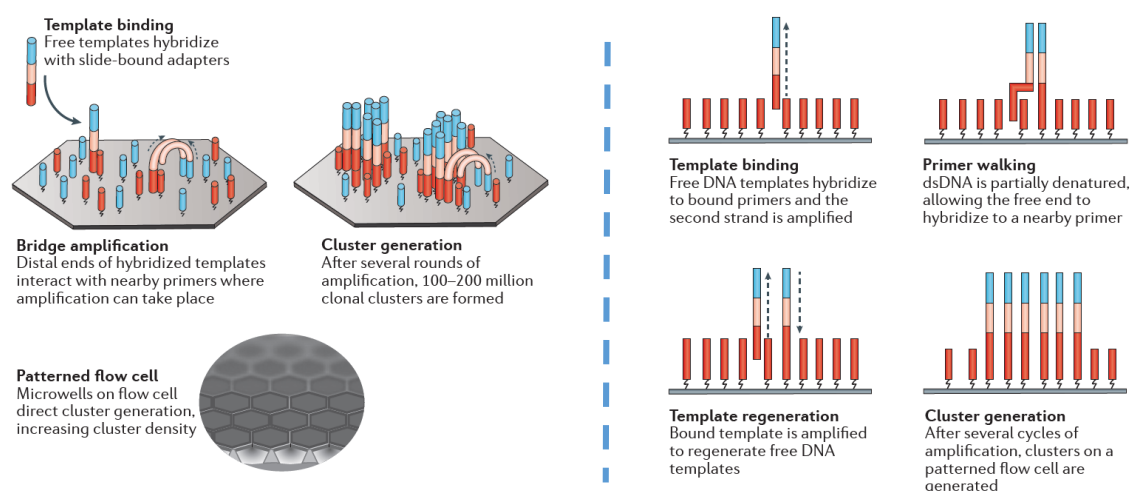


Figura 2. Proceso de PCR puente (izquierda) y “template walking” (derecha) (4).

- c) *Template walking* en fase sólida: utilizada al trabajar con el equipo SOLiD Wildfire (Thermo Fisher) es similar a la PCR en puente. El ADN fragmentado se liga a secuencias adaptadoras que hibridan con los cebadores, unidos a una superficie sólida. La reacción de PCR genera la hebra complementaria. Esta estructura de ADN de doble hebra está parcialmente desnaturizada y permite que el extremo libre del ADN original se una a otro cebador cercano (figura 2).

d) Nanobolas de ADN en solución: utilizado al trabajar con el equipo Complete Genomics (BGI). El ADN fragmentado se une al primero de cuatro adaptadores, se amplifica, se circulariza y se corta con una endonucleasa tipo II. Este proceso se repite tres veces más hasta incluir cuatro adaptadores. Posteriormente, se produce una amplificación por círculo rodante que genera una gran masa de concatémeros (denominada nanobola de ADN), que se deposita luego sobre una superficie sólida (figura 3).

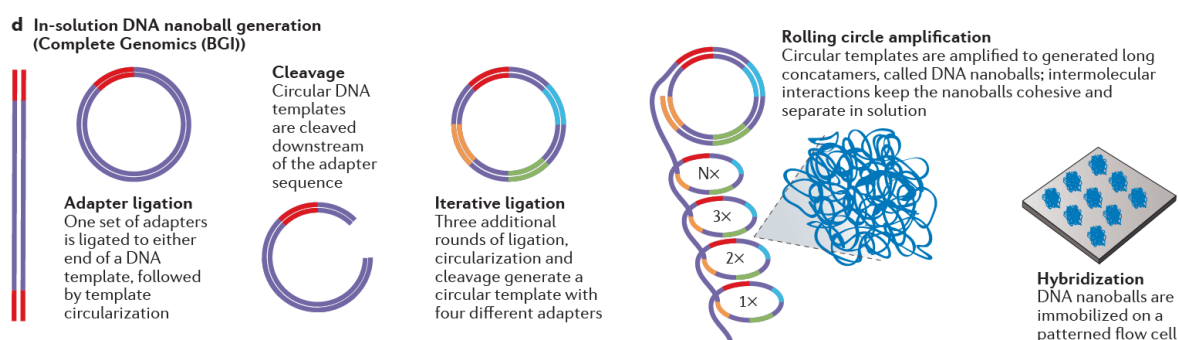


Figura 3. Proceso de amplificación con nanobolas de ADN en solución (4).

Dentro de la tecnología short-read NGS hay dos abordajes diferentes: secuenciación por ligación (SBL) y secuenciación por síntesis (SBS). Ambas estrategias conformarían la denominada secuenciación de segunda generación.

#### 3.1.2.1.2. Secuenciación por ligación

En este tipo de metodología, una secuencia sonda hibrida con el adaptador añadido durante la PCR previa. Esta sonda va seguida de uno o dos nucleótidos conocidos y de una serie de bases universales unidas a un fluoróforo. El espectro de emisión del fluoróforo indica el tipo de base o bases complementarias a las posiciones específicas de la sonda. Tras detectar la emisión, se eliminan las últimas bases junto con el



fluoróforo y se inicia un nuevo ciclo con otra nueva sonda que hibrida con el ADN molde y se liga a la anterior. Hay dos plataformas disponibles:

- SOLiD (Thermo Fisher)
- Complete Genomics (BGI)

### 3.1.2.1.3. Secuenciación por síntesis

Son métodos basados en la síntesis de ADN por medio de la ADN polimerasa. Existen dos mecanismos diferentes:

- Terminación cíclica reversible (CRT): las plataformas englobadas en esta categoría comparten el uso de un terminador de elongación de la cadena en el que el grupo 3'-OH de la ribosa se encuentra bloqueado. La secuenciación, que se realiza en fase sólida, comienza con la adición de cebadores complementarios de los adaptadores del ADN molde y la consiguiente elongación de la cadena, en presencia de los cuatro nucleótidos marcados y con la posición 3'-OH de la ribosa bloqueada. Tras la elongación de la hebra en un único nucleótido se detecta el nucleótido añadido en cada grupo de moléculas de ADN idénticas. A continuación, se produce el desbloqueo del grupo 3'-OH de la ribosa y comienza un nuevo ciclo. Las dos plataformas que utilizan esta tecnología son:
  - Illumina: es actualmente la plataforma con mayor difusión en el mercado. Dispone de equipos con diferentes rangos de tamaño de fragmentos secuenciados. Algunos de los más conocidos son los sistemas MiniSeq, MiSeq, MiSeq Dx, NextSeq, NextSeq 550 y HiSeq. La detección del nucleótido añadido se hace mediante microscopía de reflexión interna

fluorescente. El proceso completo de secuenciación se muestra en el esquema de la figura 4.

- Gene Reader (Qiagen): se trata de un sistema “todo en uno” que engloba desde la preparación de la muestra hasta su análisis bioinformático.
- Adición de nucleótido único (SNA): las plataformas que se engloban bajo esta denominación comparten la característica de detectar una única señal, por lo que cada uno de los cuatro nucleótidos ha de añadirse en una ronda diferente. La ventaja es que no se requieren extremos bloqueados para prevenir la elongación porque el siguiente nucleótido no estará disponible, a excepción de regiones homopolímeras, en las que se detectará la adición de más de un nucleótido por aumento en la intensidad de la señal. Esta señal se detecta a través de moléculas químicas. Los dos equipos desarrollados con esta tecnología permiten lecturas de secuencias con tamaños superiores al resto de equipos.
  - 454 (Roche): las bolitas provenientes de la PCR en emulsión rodeadas de grupos de moléculas idénticas de ADN se dispensan en una placa de picotiter junto con la mezcla enzimática necesaria para la reacción de secuenciación. Cuando un nucleótido es incorporado a la hebra de ADN, la molécula de pirofosfato liberada provoca una cascada enzimática mediante las moléculas luciferina/luciferasa que se traduce en la emisión de luz detectable. El equipo 454 pyrosequencing fue el primer secuenciador NGS desarrollado y permitía lecturas de hasta 700pb. Tras

ser discontinuado en 2016, este equipo ya no se fabrica. En la imagen 4 se resume el proceso de pirosecuenciación (7).

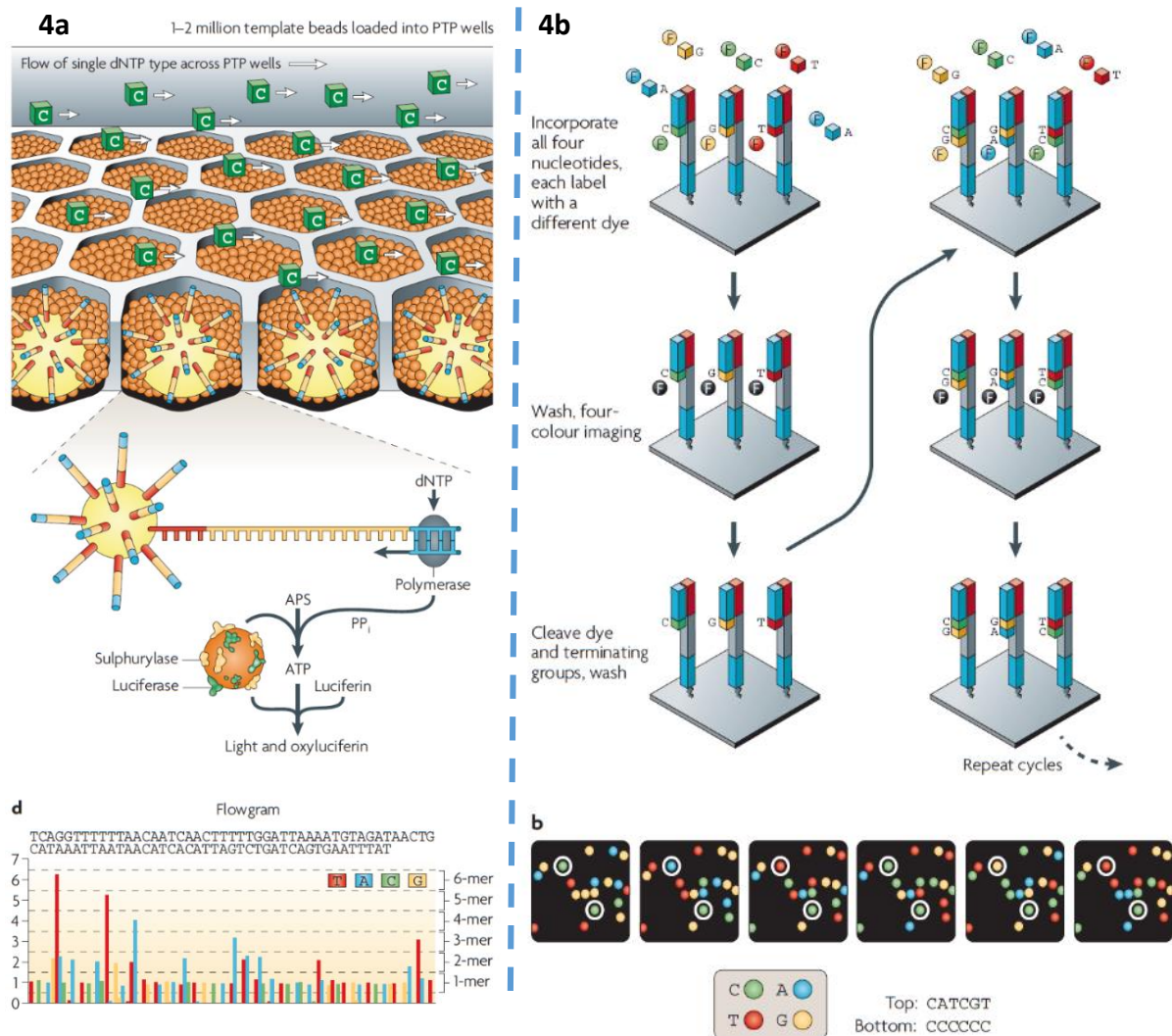


Figura 4. Proceso de secuenciación con las plataformas 454 (4a) e Illumina (4b) (7).

- Ion Torrent (Thermo Fisher): fue la primera plataforma sin un detector óptico. Su sistema de detección se basa en el cambio de pH que provocan los iones  $H^+$  liberados durante el proceso de elongación de la hebra de ADN.

### 3.1.2.2. Long-read NGS

Debido a la evidente complejidad de los genomas, con muchas regiones largas repetitivas, variaciones estructurales y alteración en el número de copias se ha visto la necesidad de diseñar equipos que sean capaces de generar lecturas más largas, de modo que estas regiones se secuencien en una única lectura, evitando errores a la hora de ensamblarlas. Actualmente, se diferencian dos tipos de tecnologías *long-read*, basados en el fundamento de las tecnologías *short-read* NGS (4):

- Secuenciación en tiempo real de molécula única
  - PacBio
  - ONT
  - MinION
- Sintético
  - Illumina
  - 10X Genomics

### 3.1.3. Análisis de los resultados

Las técnicas NGS generan una gran cantidad de datos informáticos. El archivo que se obtiene tras acabar la secuenciación contiene las secuencias de nucleótidos para cada fragmento secuenciado. Este archivo ha de someterse a filtrados de calidad previos al inicio del análisis bioinformático. Actualmente, existen herramientas gratuitas online que permiten el análisis de datos NGS en poco tiempo y sin las limitaciones de un ordenador personal. Las herramientas a utilizar serán diferentes en función del tipo de datos a analizar. Algunos ejemplos son:

- Herramientas para análisis de metagenómica del gen ARNr 16S:

- QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*): es una plataforma bioinformática gratuita que funciona en entorno Linux. Permite a los usuarios obtener gráficos y estadísticas en calidad de publicación a partir de los datos de secuenciación generados en diversas plataformas, entre ellas Illumina y 454 (8).
- *Ribosomal DataBase Project* (RDP): es una base de datos del gen bacteriano ARNr 16S, que además contiene herramientas para analizar secuencias de dicho gen (9).
- *Galaxy*: es una plataforma online que ofrece una serie de recursos para el análisis metagenómico y funcional, destinados tanto a la investigación como al uso académico (10).
- R: es un entorno y lenguaje para el cálculo estadístico y la generación de gráficos. Ofrece un lenguaje de programación completo con el que añadir nuevas técnicas mediante la definición de funciones.
- Herramientas para el análisis genomas bacterianos completos
  - *Spades*: herramienta que permite ensamblar genomas bacterianos (11)
  - *Prokka*: es una herramienta gratuita basada en lenguaje Perl que permite anotar completamente un genoma bacteriano en unos 10 minutos utilizando un ordenador de sobremesa (12).
  - BLAST (*Basic Local Alignment Tool*): herramienta online del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) que permite encontrar similitudes entre secuencias (13)

- *Center for Genomic Epidemiology*: entorno web con multitud de herramientas para el análisis de genomas bacterianos. A partir de un genoma ensamblado permite reconocer factores de virulencia y determinantes de resistencia antibiótica. También permite realizar *multi locus sequence typing* (MLST), entre otras muchas opciones (14).
- *PGAdb-builder*: herramienta web que permite crear una base de datos de alelos pan-genómicos, obtener el genoma *core* y el árbol filogenético basado en el mismo (15).
- *iTOL (Interactive Tree of Life)*: herramienta web que permite visualizar y editar árboles filogenéticos (16).

### 3.1.4. Aplicaciones de la secuenciación masiva en el ámbito de la microbiología clínica

La secuenciación masiva ha supuesto un gran avance en el campo de la microbiología clínica. Aunque actualmente no se encuentra incorporada como una herramienta de rutina en la mayoría de centros, el acceso a la misma a través de servicios externos permite llevar a cabo estudios en diversos ámbitos. Algunas de sus aplicaciones son (17):

- Manejo de brotes.
- Caracterización y epidemiología de patógenos.
- Secuenciación de regiones ARNr 16S-23S en muestras clínicas.
- Secuenciación de genomas completos y taxonomía.
- Metagenómica.
- Transmisión de microorganismos zoonóticos.

### 3.2. *Helicobacter pylori*

#### 3.2.1. Antecedentes históricos

La relación de *Helicobacter pylori* con el ser humano, se remonta a 58.000 años de evolución y migraciones (18), pero ha sido necesario más de un siglo de minuciosos estudios para comenzar a comprenderla.

Las primeras referencias de molestias gástricas, con ardor y aerofagia, se atribuyen a Hipócrates (siglos IV-V a.C.), mientras que Marcello Donati a finales del siglo XVI hizo la primera descripción de un caso de úlcera gástrica. Entre los siglos XVII y XIX se llevaron a cabo varios estudios y publicaciones sobre la patología de las úlceras gástricas, su cronificación y su probable evolución a cáncer gástrico. También se demostró la producción de ácido clorhídrico por la mucosa gástrica, se detectó amonio en el jugo gástrico y se estableció la relación entre la atrofia gástrica y la anemia perniciosa. Sin embargo, aún se desconocía la causa de estas patologías digestivas. Se barajaron varias hipótesis para explicarlas: irritación, nerviosismo excesivo, alteraciones en la vascularización, la naturaleza de las aguas y alimentos ingeridos y algunos agentes como bacterias, levaduras y hongos (19).

Durante el siglo XIX, Cohn, mentor de Robert Koch, clasificó las bacterias en cuatro grupos (*sphaerobacteria*, *microbacteria*, *desmobacteria* y *spirobacteria*) y con ello estableció las bases de la bacteriología moderna (20). Con la extensión del uso del microscopio se hizo una importante observación: en la mucosa gástrica de pacientes con enfermedades estomacales se observaba una variedad de microorganismos que no se visualizaba en los pacientes sanos. Este detalle llevó a los investigadores del siglo XIX a pensar en un posible papel de los microorganismos en la patología gástrica. Fueron el alemán G. Bottcher y su colaborador francés M. Letulle quienes afirmaron por primera

vez que la etiología de las úlceras era bacteriana al observar células bacterianas en los márgenes y en el fondo de las úlceras gástricas (21). Aunque hubo otras descripciones en la misma dirección (22), la hipótesis bacteriana cayó en desuso. En 1889, el profesor Jaworski, de la Universidad de Cracovia, describió detalladamente unos microorganismos espirales en el sedimento de lavados gástricos humanos, a los que denominó *Vibrio rugula*, y los relacionó con las patologías gástricas (23). Sin embargo, algunos científicos de la época lo contradijeron afirmando que las células observadas por Jaworski eran restos celulares formados por la acción de los jugos gástricos (24). Debido a esto, y a la publicación de los resultados de Jaworski en polaco, las observaciones del profesor no tuvieron impacto en la comunidad científica. Letulle, que aún trataba de demostrar la etiología bacteriana de las úlceras, diseñó un experimento con el que consiguió generar úlceras gástricas en conejillos de indias administrándoles por vía oral diferentes bacterias (25). A finales de siglo, la idea más extendida era que la presencia bacteriana era, si no la causa de las úlceras, al menos un requisito indispensable, aunque el papel de las espiroquetas aún no estaba claramente definido (19). Durante los últimos años del siglo XIX, el anatomista italiano G. Bizzorero y su discípulo C. Golgi observaron espiroquetas en las glándulas gastrointestinales y células parietales de estómagos de perro (26). Tres años más tarde, H. Salomon describió los mismos hallazgos en mucosa gástrica de perros, gatos y ratas y consiguió colonizar ratones blancos con este microorganismo administrándoles por vía oral moco gástrico de perros colonizados (27).

Con la llegada del siglo XX, se extendió la idea de que la hiperclorhidria era la causa de las úlceras gastroduodenales (19). Sin embargo, Krienitz, en 1906, identificó espiroquetas en el contenido gástrico de un paciente con carcinoma gástrico (28). Otros



científicos del momento, como Turck y Rosenow, seguían tratando de demostrar que el agente etiológico de las úlceras digestivas era una bacteria (29,30). El último sostenía que *Streptococcus* era el género causante de las úlceras y las piezas dentales con caries su reservorio (31–33). Pocos años después, L. R. Dragstedt, un cirujano estadounidense que practicaba vagotomías para reducir la hiperclorhidria gástrica, afirmó que las bacterias que se encontraban en las úlceras no eran más que meros colonizadores que migraban desde el tracto digestivo (34). J. S. Edkins, descubridor de la gastrina, dio otro enfoque a los experimentos sobre la causa de las úlceras gástricas abandonando los experimentos de inoculación para centrarse en las características del hospedador (pH, ayuno, etc.) que podían afectar a la distribución y prevalencia de las espiroquetas del estómago, describiendo por primera vez estructuras “en forma de haba” (35). En los albores de la Segunda Guerra Mundial, debido a la expansión de la sífilis, los estudios sobre espiroquetas gástricas volvieron a tomar relevancia. Así, J. L. Doenges, observó espiroquetas en las glándulas gástricas de monos *Macacus rhesus* y puntualizó que no estaban presentes a nivel intestinal (36). Las observaciones que otros autores llevaron a cabo en pacientes que se habían sometido a una resección gástrica parcial no eran equiparables a las de Doenges y por ello concluyeron que estos microorganismos no podían tener un papel etiopatológico absoluto en el desarrollo de úlceras gástricas (37). Curiosamente, los propios detractores de la hipótesis bacteriana como causa de úlcera gástrica, trataban a sus pacientes con sales de bismuto, un compuesto con conocidas propiedades antibacterianas.

En los años 50, E. D. Palmer estudió biopsias gástricas de 1.180 pacientes, y dado que no pudo demostrar mediante técnicas histológicas la presencia de las espiroquetas, concluyó que el estómago era una cavidad estéril que los microorganismos colonizaban

*post-mortem* desde la cavidad oral (38). Su trabajo hizo retroceder 30 años la investigación en bacteriología gástrica. Ni siquiera el descubrimiento de la actividad ureasa en la mucosa gástrica y la confirmación de su origen bacteriano unos años antes llevaron a correlacionar los microorganismos productores de ureasa con la etiología de la úlcera gástrica (39–42).

Hubo que esperar hasta 1975 para que Steer, mediante microscopía electrónica, observase la ingestión de bacterias por parte de leucocitos polimorfonucleares en la mucosa gástrica de pacientes con úlcera gástrica (43). Intentó aislar y cultivar el microorganismo, pero dado que no estaba familiarizado con las técnicas microaerófilas, la bacteria identificada resultó ser *Pseudomonas aeruginosa*. En el mismo periodo de tiempo, en Australia, el patólogo Robin Warren llevaba años observando bacterias en el estómago de pacientes con gastritis y estaba convencido de su relación etiológica. Sin embargo, debido a la hipótesis aceptada de que las úlceras gástricas estaban producidas por la hiperacidez, nunca defendió su postura frente a la comunidad gastroenterológica. Fue un joven Barry Marshall quien, desesperado por encontrar un proyecto, decidió investigar más a fondo esta hipótesis de su mentor. Sus resultados iniciales fueron rechazados para su publicación en la Asociación Australiana de Gastroenterología, pero el “*International Workshop of Campylobacter Infections*” sí lo aceptó, levantando cierto interés entre algunos de sus miembros, que trataron de reproducir los experimentos de los australianos (19). Al poco tiempo, Warren y Marshall publicaron sus hallazgos en dos cartas en la revista *Lancet* (44,45), donde describían la constancia de la infección bacteriana y la consistencia de los cambios histológicos que habían advertido en 135 biopsias gástricas. Destacaban, además, que la presencia bacteriana era más numerosa en las biopsias de pacientes con gastritis crónica activa y

que en ellas se observaba infiltración granulocítica y alentaban al reconocimiento e investigación del microorganismo. Dado que la morfología de la bacteria les recordaba a la de *Campylobacter spp.* más que a las espiroquetas, decidieron tratar de cultivar el microorganismo en agar chocolate y condiciones microaerofílicas. Todas las placas eran estériles a las 48h, pero la casualidad hizo que la placa correspondiente a la biopsia gástrica número 35 se quedase incubando durante las vacaciones de Semana Santa: 6 días. Así se consiguió el primer cultivo de *Campylobacter pyloridis* (que se renombró posteriormente como *C. pylori*) y con ello se demostró el segundo postulado de Koch: el germen debe obtenerse del sujeto enfermo y cultivarse fuera del cuerpo. Para demostrar los postulados tercero y cuarto de Koch (el agente aislado en cultivo debe ser capaz de producir enfermedad en sujetos sanos y debe poder aislarse de nuevo a partir de estos), Marshall recibió vía oral un aislado de un hombre con dispepsia y sin úlcera gástrica (46). Durante los siguientes 14 días, Marshall desarrolló los síntomas propios de la primoinfección por *H. pylori* y demostró a nivel histológico la presencia de gastritis. El decimoquinto día, el proceso se resolvió por sí solo. Morris, otro australiano, decidió repetir el experimento de Marshall e ingirió el mismo inóculo que él, sin conseguir establecer una infección. Cuando lo intentó con otra cepa, generó un proceso infeccioso que no consiguió curar hasta cinco años después. Gracias a este experimento, Morris y Nicholson pudieron establecer una relación directa entre la infección y la elevación del pH gástrico (47).

En 1985 se publicó en España el primer trabajo donde se describe el cultivo de *Campylobacter* a partir de biopsia gástrica (48) y en 1989, Thomas Borody, publica la triple terapia para el tratamiento de las úlceras duodenales (49).

Desde que se cultivara por primera vez, se había sospechado que quizás *C. pylori* no fuera un verdadero *Campylobacter*. Su disposición flagelar y los patrones proteicos y lipídicos de su pared así lo indicaban. En 1989, tras la secuenciación de la región 16S del ARN ribosómico de la bacteria, se propuso incluirla en un nuevo género, *Helicobacter* (50), como referencia al movimiento helicoidal de sus flagelos. Así, la bacteria pasó a denominarse *Helicobacter pylori*, en referencia al píloro.

No fue hasta 1994 que el Instituto Nacional de Salud relacionó *H. pylori* con la úlcera péptica y recomendó el uso de antibióticos para su tratamiento (51). En el mismo año, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), clasificó *H. pylori* como agente carcinogénico de clase 1 (52).

La comunidad científica reconoció la importante labor de J. R. Warren y B. J. Marshall y 23 años después de su descubrimiento, en 2005, fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina, “por el descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica” (53).

### 3.2.2. Características microbiológicas

El género *Helicobacter* pertenece a la familia *Helicobacteraceae*, orden *Campylobacterales*, clase *Epsilonproteobacteria*, filo *Campylobacterota* (reclasificada recientemente desde el filo *Proteobacteria*) (54,55). Hasta la fecha se han identificado unas 30 especies en este género, siendo *H. pylori* la especie tipo.

*Helicobacter* es un bacilo Gram-negativo, que tiene forma espiral o bacilar en los cultivos recientes y un tamaño de 0,5-1  $\mu\text{m}$  x 2-4  $\mu\text{m}$ . En los cultivos más envejecidos puede adoptar una morfología cocoide que algunos autores relacionan con formas de resistencia y otros con estadios de degeneración celular y que no se ha conseguido

subcultivar. *H. pylori* presenta, en cultivo en placa de agar, colonias de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro y de apariencia translúcida y ligeramente brillante. Las condiciones óptimas de cultivo son 35-37°C, con niveles de oxígeno del 5-10% y niveles de dióxido de carbono del 5-12%, ya que el género *Helicobacter* es microaerófilico.

A nivel metabólico, estas bacterias son quimiorganotrofas y presentan un metabolismo respiratorio. Su identificación bioquímica es compleja, ya que el género *Helicobacter* no fermenta ni oxida carbohidratos (son bacterias asacarolíticas), aunque *H. pylori* es capaz de oxidar la glucosa. Sin embargo, presenta positividad en tres pruebas sencillas de realizar en el ámbito de la microbiología clínica y de gran utilidad en su identificación bioquímica: ureasa, catalasa y oxidasa.

En cuanto a su movilidad, *H. pylori* posee 4-8 flagelos polares envainados de 3  $\mu\text{m}$  de longitud y con una protuberancia distal que le confieren su típico movimiento en sacacorchos. (56)

### 3.2.3. Características genómicas

En 1997 se secuenció el primer genoma completo de *H. pylori* (cepa 26695) (57). Dos años después se publicó el genoma completo de la cepa J99 (58). En 2017, el número de genomas completos de *H. pylori* depositados en la base de datos GeneBank rondaba los 700 (59). La secuenciación del genoma completo de *H. pylori* ha permitido conocer que se trata de una sola molécula circular de ADN, con un tamaño de entre 1,5-1,8 Mpb y unas 1590 secuencias codificantes (CDS). Tiene la peculiaridad de poseer zonas de plasticidad, en las cuales se codifican genes específicos de cada cepa (60).

Actualmente, el *National Cancer Institute* está realizando un estudio observacional de casos y controles que pretende conocer mejor el genoma de *H. pylori* y su papel en el cáncer gástrico (61).

#### 3.2.4. Patogenia y factores de virulencia

La patogenia y evolución clínica de la infección por *H. pylori* están mediadas por la interacción entre los factores de virulencia de la bacteria, el hospedador y factores ambientales. Una vez que *H. pylori* alcanza el estómago del hospedador, hay cuatro pasos críticos para que la colonización se produzca con éxito (62):

- I. Supervivencia en las condiciones ácidas del estómago.
- II. Movimiento a través de las células de epitelio gástrico mediado por flagelos.
- III. Unión a las células de la mucosa gástrica mediada por adhesinas de la bacteria y receptores del hospedador.
- IV. Daño tisular causado por la liberación de la toxina bacteriana.

Se han descrito muchos genes de virulencia en *H. pylori* relacionados con su evolución clínica que, generalmente, se clasifican en 3 grupos (63):

- a) Genes específicos de cepa: genes presentes solo en algunas cepas de *H. pylori*, por ejemplo *cagPAI*.
- b) Genes de fase variable: genes que están presentes en todas las cepas pero cuyo estado de expresión varía durante el crecimiento o bajo diferentes condiciones para adaptar la fisiología de *H. pylori* al ambiente y asegurar su supervivencia, por ejemplo ciertas proteínas de membrana externa (OMPs).
- c) Genes con estructuras y genotipos variables o genes mosaico: genes presentes en todas las cepas cuya función y/o niveles de expresión varían según las cepas

o son producto de recombinación de genes cromosómicos con material genético adquirido, por ejemplo *vacA*.

En este apartado se tratarán las características, modo de acción e importancia clínica de los principales factores de virulencia de *H. pylori* clasificados en función de los roles que ocupan en la colonización y patogénesis.

#### 3.2.4.1. Factores de virulencia que permiten la supervivencia en condiciones ácidas: Ureasa

*H. pylori* es capaz de ajustar su pH periplásmico en el ambiente extremadamente ácido del estómago gracias a su actividad ureasa. Ésta se encuentra codificada en un *cluster* de 7 genes que incluye las unidades catalíticas (*ureA/B*), un canal de urea ácido dependiente (*ureI*) y proteínas estructurales accesorias (*ureE-H*). La ureasa de *H. pylori* es un holoenzima que necesita níquel como cofactor y en su proceso de captación participan las metalochaperonas *UreE* y *HypA* (64). El canal de urea, ácido dependiente, permite la entrada de urea al interior bacteriano solo en condiciones ácidas, para evitar una alcalización letal. Este canal se encuentra cerrado a pH 7,0 y abierto totalmente a pH 5,0. Como consecuencia de la entrada de urea, *H. pylori* genera grandes cantidades de amoníaco (según la reacción  $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$ ) que rápidamente es enviado hasta la membrana interna para neutralizar los protones que entran desde el estómago hasta el periplasma (65). También se hipotetiza que estos derivados nitrogenados de la urea puedan ser asimilados por la bacteria para la síntesis de aminoácidos (66). Debido a la lisis de otros microorganismos productores de ureasa, este enzima también se encuentra en la superficie de *H. pylori*. Esta ureasa extracelular permitiría combatir la acidez del medio circundante a la bacteria, de forma que esta

podría avanzar por la mucosa gástrica (66,67). Del mismo modo, la ureasa podría regular el pH de los fagosomas y la formación del megasoma, lo que ayudaría a la supervivencia de *H. pylori* en el interior de los macrófagos (68).

La rapidez del ajuste del pH periplásmico se debe a un sistema de dos componentes de membrana denominado ArsRS, que controla la transcripción del *cluster* de genes de la ureasa de forma ácido dependiente (69).

#### 3.2.4.2. Factores de virulencia que permiten el movimiento bacteriano: Flagelos

*H. pylori* posee entre 4 y 7 flagelos polares que le permiten moverse desde la capa epitelial de la mucosa gástrica hasta la capa basal, donde el pH es cercano a 7. Estudios en modelos animales han demostrado que la existencia de flagelos es esencial para que produzca la colonización y por ello se consideran los flagelos de *H. pylori* como un factor temprano de colonización/virulencia (70,71).

Los flagelos de *H. pylori* están constituidos por un cuerpo basal, un gancho y un filamento flagelar (Figura 5), este último formado por las proteínas FlaA y FlaB, codificadas por los genes del mismo nombre. El gancho está compuesto por la proteína FlaE y su función es unir el cuerpo basal con el filamento flagelar. El cuerpo basal está constituido por varias proteínas y tiene

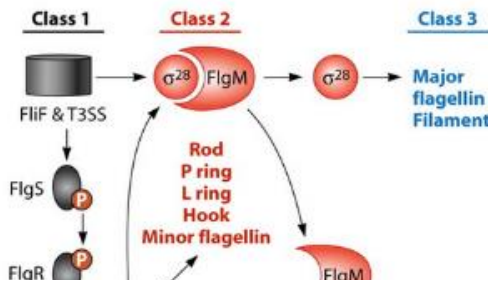
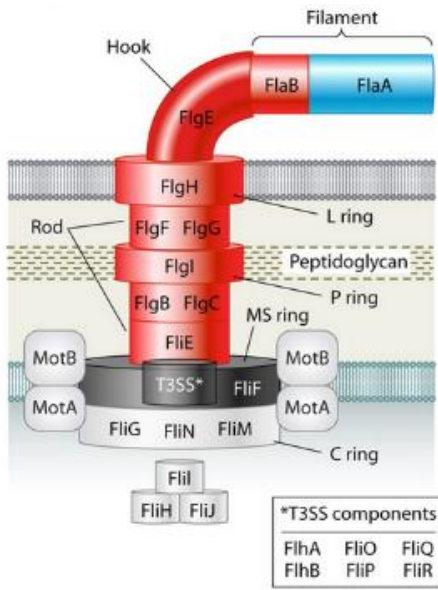


Figura 5. Esquema de la estructura flagelar de *C. jejuni* (representativa de *H. pylori*) y las cascadas que regulan su biosíntesis (68).



función energética. En total, más de 40 proteínas son necesarias para la biosíntesis y funcionamiento de los flagelos, siendo la motilidad uno de los procesos más complejos de cuantos ocurren en la célula bacteriana (72).

Los genes relacionados con los flagelos se dividen en 3 clases (Figura 5) (73):

- Clase 1: aquí se engloban los principales genes reguladores (*rpoN*, *flgR*, *flgS*, *flhA*) y estructurales (*motA* y *motB*) cuya transcripción es dependiente del factor de la RNA polimerasa  $\sigma^{80}$  (RpoD).
- Clase 2: se incluyen aquí los genes flagelares intermedios (*flaB*, *flgE*, *flgK*, *flgM* y *flgL*) y el factor  $\sigma^{28}$ . Su transcripción es dependiente del factor  $\sigma^{54}$  (RpoN) asistido por la histidín quinasa FlgS y el regulador de respuesta FlgR.
- Clase 3: engloba los genes estructurales tardíos, incluyendo *flaA*, cuya transcripción dependiente del factor  $\sigma^{28}$  (FlhA).

#### 3.2.4.3. Factores de virulencia que permiten la adhesión a las células diana

Una vez que *H. pylori* ha colonizado la mucosa gástrica, es necesario que se adhiera a las células epiteliales, de modo que no pueda ser arrastrada por el peristaltismo y el vaciado gástrico (62) y la infección pueda persistir. Además la adherencia facilita la evasión del sistema inmune y la introducción de proteínas que actúan como factores de virulencia dentro de las células epiteliales. Por lo tanto, las cepas con mejores propiedades adherentes, colonizan de forma más eficiente (74).

Las proteínas encargadas de la adherencia corresponden al grupo de proteínas denominadas de membrana externa (OMPs). Todas las cepas de *H. pylori* poseen genes codificantes para OMPs, pero a diferencia de otras bacterias Gram negativas, en *H. pylori*

no hay una clara predominancia de ciertas OMPs sino que presenta muchas OMPs expresadas en baja abundancia. Aproximadamente el 4% del genoma de *H. pylori* está ocupado por genes codificantes para OMPs (unas 64 en total), que se dividen en 5 familias de genes parálogos (74):

- Familia 1: genes Hop (21 miembros) y Hor (12 miembros).
- Familia 2: genes Hof (8 miembros)
- Familia 3: genes Hom (4 miembros)
- Familia 4: OMPs reguladas por hierro (6 miembros)
- Familia 5: bombas de expulsión (3 miembros)

Se conocen unas 10 OMPs restantes que no se clasifican en ninguna de estas familias.

El nivel de expresión de las OMPs puede regularse gracias a varios mecanismos. Los más importantes son la conversión génica, la duplicación génica, la variación alélica y la variación de fase. En este último mecanismo, su estado de expresión varía entre activo a inactivo. Este estado funcional está regulado por un mecanismo de *mispairing* con deslizamiento de hebra mediado por el número de dinucleótidos CT en la región 5' de los genes.

Las moléculas de las que se dispone de mayor información son las siguientes:

a) **BabA** (*Blood group Antigen-Binding Adhesion*):

También conocida como HopS u OMP28, es una proteína de unos 80 kDa codificada por el gen *babA*. Es la adhesina mejor caracterizada de *H. pylori*. Se une principalmente a los antígenos Lewis b fucosilados (Le<sup>b</sup>) que se expresan en las células del epitelio gástrico humano. El gen *babA* tiene dos parálogos: *babB*, que codifica la proteína BabB,

HopT u OMP19 y *babC*, que codifica la proteína BabC, HopU u OMP9. Su función no se conoce con claridad pero presentan alta homología con *babA* en los extremos 5' y 3', lo que sugiere que la función adhesina se halla en la región media.

De los dos alelos *babA* conocidos (*babA1*, *babA2*), solo el producto de *babA2* tiene capacidad de unión a Le<sup>b</sup> (75). Se ha descrito que la coexpresión de los genes *babA2*, *cagA* y *vacA* s1 y m1 tiene efecto sinérgico en el empeoramiento de la inflamación y podría ser un riesgo potencial de metaplasia intestinal (76).

b) **SabA** (*Sialic Acid-Binding Adhesin*):

También denominada HopP o OMP17, es una proteína de unos 70 kDa codificada por el gen *sabA*. Tiene dos ortólogos, SabB (HopO, OMP16) y HopQ (OMP27), codificados por los genes *sabB* y *hopQ*, respectivamente. La infección por *H. pylori* induce la expresión de carbohidratos sialilados como parte de los gangliósidos complejos del tejido gástrico inflamado. Estas estructuras de la célula diana son reconocidas por SabA, que permite la unión de la bacteria a la superficie celular, indispensable para causar infección permanente y enfermedad (75). Según un estudio taiwanés, la prevalencia de *sabA* en aislados clínicos es cercana al 80% y en los pacientes con cepas *sabA* positivas la densidad de *H. pylori* es superior. Además, el hecho de ser una molécula sujeta a variación de fase permite a *H. pylori* escapar de microambientes donde la respuesta bactericida del huésped es más potente (77).

c) **OipA** (*Outer Inflammatory Protein*):

La proteína proinflamatoria OipA, también conocida como HopH u OMP13 (~34 kDa), está codificada por el gen *oipA*. Se correlaciona con los niveles de IL-8 en la mucosa

gástrica (78). Está presente en el 97,5% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal y solo en el 70% de los pacientes con gastritis crónica (79).

#### **d) AlpA y AlpB**

Las lipoproteínas AlpA (HopC o OMP20, ~56 kDa) y AlpB (HopB o OMP21, ~57 kDa) están codificadas por los genes *alpA* y *alpB*, respectivamente. Ambas se encuentran formando un complejo de membrana y están implicadas en la colonización gástrica. Aparentemente, se producen a la vez y se expresan en todos los aislados clínicos (74).

#### **e) HopZ**

Codificada por el gen *hopZ* (*omp1*), la proteína HopZ (74kDa) se encuentra en la superficie de la bacteria. Su papel en la adherencia y la colonización no está del todo establecido, pero sí se ha descrito que los pacientes con linfomas MALT expresan menos HopZ (74).

#### **f) HomB**

La proteína HomB (75kDa) se encuentra codificada por el gen *homB* y tiene un parálogo, *homA*, que codifica la proteína HomA, con el que comparte un 90% de homología. Se han identificado 6 alelos pero no se ha descrito relación entre ninguno de ellos y la evolución de la enfermedad, ni tampoco relación con el origen geográfico de la cepa. Sí se ha constatado que el número de copias de *homB* influye en la secreción de IL-8 y en la adherencia de la cepa al epitelio gástrico. Además, la presencia de *homB* se asocia a presencia de *cagA* así como a inflamación y atrofia del cuerpo gástrico, lo que sugiere a *homB* como marcador de cepas particularmente virulentas (74).

### 3.2.4.4. Factores de virulencia que son sistemas de secreción tipo IV (SST4)

#### a) *cagPAI* (Cytotoxin-Associated Gene Pathogenicity Island)

Descubierta en 1996, es un elemento de inserción cromosómico que constituye una isla de patogenicidad. Ocupa una región cromosómica de 40kb que codifica unos 31 genes cuyos productos forman y regulan un sistema de secreción tipo IV (SST4). Éste permite la entrada de la oncoproteína CagA, también codificada en la isla por el gen *cagA*, en el citosol de las células del epitelio gástrico (Figura 6).

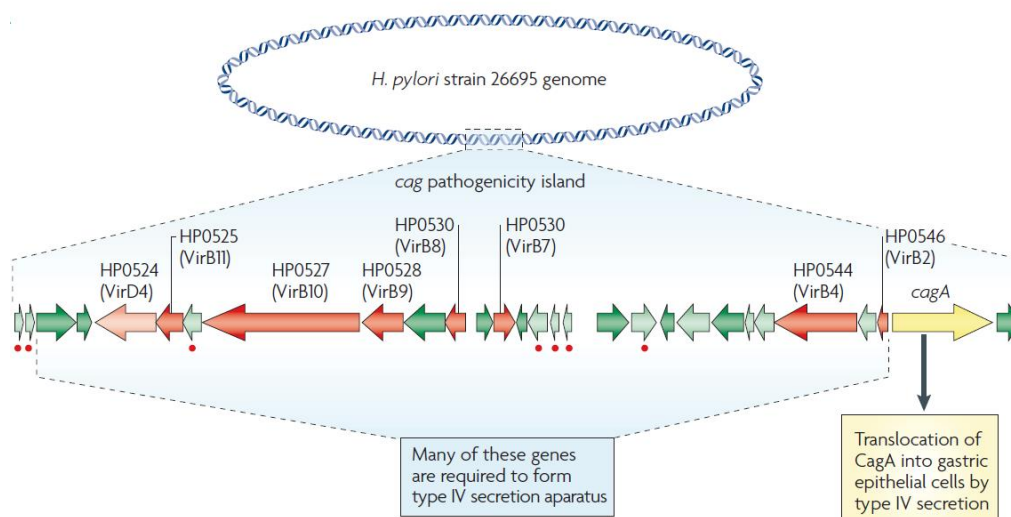


Figura 6. Estructura de *cagPAI* (80).

Utilizando el gen *cagA* como marcador de *cagPAI*, las cepas de *H. pylori* se clasifican en *cagA* positivas y *cagA* negativas, siendo las primeras más virulentas que las segundas. La prevalencia de cepas portadoras de *cagPAI* varía geográficamente. Así, casi todas las cepas asiáticas y africanas son *cagA* positivas, a excepción del sur de África, donde son *cagA* negativas. Entre las cepas americanas, algunas son *cagA* negativas y otras poseen la isla de patogenicidad, pero con grandes deleciones. En Europa la

presencia de *cagA* es variable. De todos modos, la presencia de todos o gran parte de los genes de la isla no garantiza un sistema de secreción tipo IV funcional (80,81), indispensable para que se produzca la entrada de CagA en las células del epitelio gástrico.

La proteína CagA está codificada por el gen polimórfico *cagA*, el más estudiado de *cagPAI*. Este gen presenta en su región 3' un número variable de secuencias repetidas que se denominan motivos EPIYA, porque codifican para la secuencia de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, y poseen un sitio de tirosín-fosforilación. De acuerdo a las secuencias que flanquean los motivos EPIYA, se distinguen cuatro segmentos EPIYA diferentes: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D (Figura 7), cada uno de los cuales contiene un único motivo EPIYA que puede ser fosforilado. Las cepas que circulan en los países de regiones occidentales (Europa, Norteamérica y Australia) poseen generalmente los motivos EPIYA-A y –B seguidos de 1 a 3 motivos EPIYA-C. La cepa más prevalente en estas regiones es de tipo A-B-C. Sin embargo, las cepas del este asiático son del tipo A-B-D.

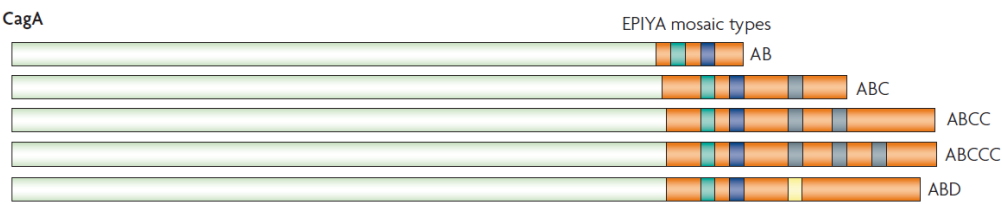


Figura 7. Posibles polimorfismos del gen *cagA*. Los motivos EPIYA aparecen en color naranja flanqueados de verde, azul, gris y amarillo según sean EPIYA-A, -B, -C o -D, respectivamente (80).

Así, una vez que la proteína CagA es introducida en la célula epitelial, se sitúa en la membrana plasmática, donde es fosforilada por quinasas de la familia Src y la quinasa c-Abl. Todos los motivos EPIYA pueden ser fosforilados en su residuo de tirosina, pero los motivos EPIYA-C y –D sufren la fosforilación con mayor frecuencia que los –A y -B.

Una vez fosforilada, la proteína CagA se integra en la membrana y se une a la tirosín fosfatasa SHP-2. Ésta tiene dos dominios SH2 (*Src Homology 2*) repetidos en tándem en la región amino terminal, un dominio PTP (proteín tirosín fosfatasa) y una cola carboxi-terminal. En condiciones normales, uno de los dominios SH2 interacciona

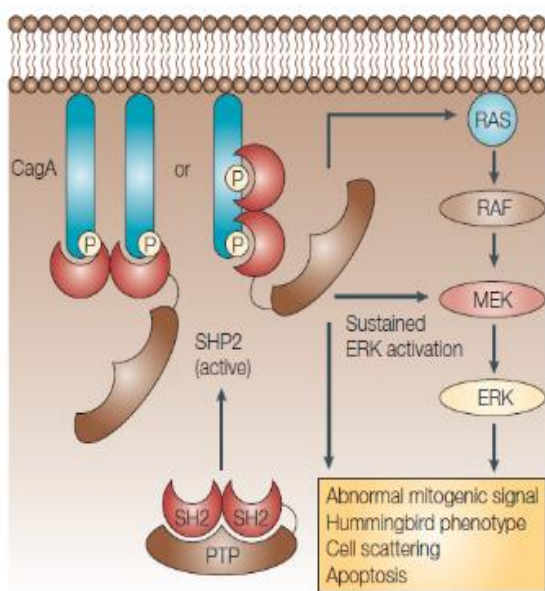


Figura 8. Cascada de señales provocada por la activación de la actividad fosfatasa de SHP-2 (77).

con el sitio catalítico del dominio PTP, impidiendo la entrada del sustrato y manteniendo la actividad fosfatasa basal de SH2 baja. Sin embargo, cuando un péptido fosfotirosil se une a uno o ambos dominios SH2, se induce un cambio conformacional que desinhibe el dominio PTP, con lo que la actividad fosfatasa se ve aumentada. Este parece ser el modo de acción de CagA (81), que provoca, por lo tanto, una serie de

eventos dependientes de su fosforilación (82) (Figura 8):

- Fenotipo *hummingbird* (colibrí) de las células del epitelio gástrico por activación de la vía ERK1/2.
- Cambios en la motilidad celular por la vía ERK/MAP quinasas.
- Reordenamiento del citoesqueleto y pérdida de las uniones celulares vía RAF.
- Apoptosis celular por actividad sostenida de SHP-2 que conlleva una regeneración continua del epitelio gástrico. Esto provoca la acumulación de mutaciones por las sucesivas rondas de replicación del ADN y, por lo tanto, contribuye en el desarrollo tumoral (81).

El hecho de que el segmento EPIYA-D tenga mayor afinidad por el dominio SH2 puede explicar las diferencias geográficas en la prevalencia de tumor gástrico (83). Por otra parte, CagA también provoca una serie de efectos independientes de su fosforilación (82):

- Disrupción de las uniones estrechas y pérdida de polaridad celular por pérdida de la actividad quinasa de Par1b/MARK2.
- Internalización bacteriana por la formación del complejo CagA, c-Met, E-cadherina y p120-catenina.
- Diferenciación celular por secuestro de E-cadherina, que provoca la acumulación de  $\beta$ -catetina, un factor con potencial oncogénico.
- Aumento de la proliferación celular por la vía ERK/MAP quinasas, que también se activa por CagA fosforilado.
- Desarrollo de linfoma MALT por disminución de la transcripción de p53 y la consecuente inhibición de la apoptosis de linfocitos B.
- Inflamación crónica por activación de NF- $\kappa$ B e inducción persistente de IL-8, una citoquina con una importante capacidad de activación de neutrófilos.

Todas estas vías provocan un grave daño en el hospedador y es necesario que exista un equilibrio para controlarlo. Así, CagA fosforilada es capaz de unirse y activar la quinasa SRC carboxi-terminal (CSK), que fosforila e inactiva a otras quinasas de la familia SRC bloqueando la fosforilación de CagA e interrumpiendo sus efectos fosforilación dependientes (81).



En cuanto al SST4, es un tipo de estructura presente en muchos géneros bacterianos, evolutivamente relacionada con los sistemas de conjugación, pero

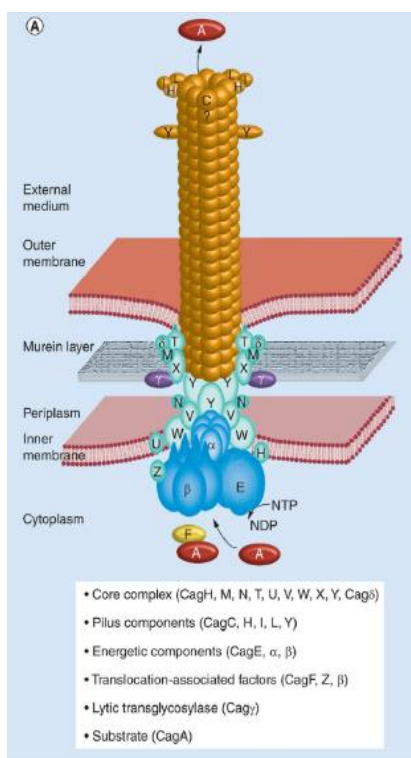


Figura 9. Estructura y localización celular esquematizadas del SST4 de *H. pylori* (84).

adaptados en algunas bacterias patógenas para introducir ADN o proteínas en el interior de células eucariotas mediante la formación de un *pilus*. En el caso de *H. pylori* la estructura de su SST4 comprende (84) (figura 9):

- Complejo *core* constituido por CagH, CagM, CagN, CagT, CagU, CagV, CagW, CagX, CagY y Cagδ.
- *Pilus* formado por CagC, CagH, CagI, CagL y CagY.
- Componentes energéticos: CagE, Cagα y Cagβ.
- Factores asociados a la translocación: CagF, CagZ y Cagβ.
- Una transglicosilasa lítica CagY .

Se ha descrito la necesidad de interacción entre varias proteínas del *pilus* y las integrinas  $\alpha_5\beta_1$  del huésped para que la translocación de CagA sea efectiva. Además, se sabe que los genes *cagT*, *cagX*, *cagV*, *cagM* y *cag3* son indispensables para el funcionamiento del SST4 y la formación del pilus, mientras que *cagY* y *cagC* son necesarias para la función del SST4 pero no para la formación del pilus (85).

### b) *comB*-SST4

*H. pylori* es una bacteria competente para la transformación genética de forma natural, lo cual le permite ganar variabilidad genética, crucial para poder mantener un estado de infección crónica; sin embargo, al contrario que muchas otras bacterias que

presentan sistemas de transformación del tipo sistemas de secreción tipo II o pilus tipo 4, en *H. pylori* este proceso está mediado por un sistema de secreción de tipo 4 denominado sistema *comB*, análogo al SST4 VirB de *Agrobacterium tumefaciens*.

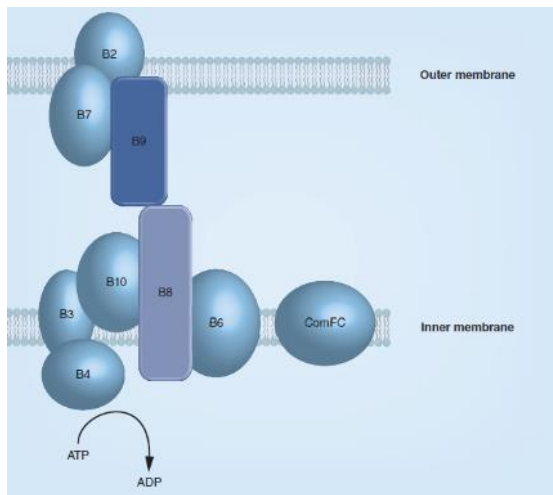


Figura 10. Esquema de la estructura y localización celular de *comB* (87).

El sistema de secreción *comB* se ha conservado a lo largo de la evolución de *H. pylori* y está presente en todas las cepas estudiadas (figura 10). Su complejo *core* está constituido por las proteínas ComB6-10. Estudios con mutantes de delección para *comB4*, *comB8*, *comB9*, *comB10* y *comB7* han demostrado que esta última, a pesar

de ser la proteína que estabiliza el canal central, no es imprescindible.

El gen *comB4* codifica una ATPasa y los genes *comB2* y *comB3* codifican proteínas de membrana (externa e interna, respectivamente).

Otras proteínas como las citoplasmáticas RecA y DprA, la proteína de membrana interna ComE3 y la proteína secretada ComH están también relacionadas con el funcionamiento de este sistema de secreción (86,87).

### c) *tfs3*

El *tfs3* (anteriormente denominado *tfs3a*) es un SST4 que incluye los genes *virB2*, *virB3*, *dupA*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11*, *virD4* y *virD2* y se ha encontrado completo solo en algunas cepas de *H. pylori*, mientras que otras, como la J99, lo presentan incompleto.

El dominio energético está constituido por las proteínas DupA, VirB11 y VirD4 y se localiza en la membrana intracelular. DupA (*Duodenal Ulcer Promoter A*) es una

proteína codificada por el gen *dupA* que presenta elevada homología con el gen *virB4*. DupA se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer úlcera duodenal y un descenso en el riesgo de desarrollar atrofia gástrica y cáncer.

VirB2 es una subunidad tipo pilus que se encuentra en la membrana externa y sería la encargada de inyectar la proteína efectora en las células del hospedador. Las proteínas VirB3, VirB8, VirB9 y VirB10 conforman una estructura en forma de aguja.

Por el momento no hay evidencia experimental de que el cluster de genes *tsf3* forme un SST4 funcional (87).

#### **d) *tfs4***

El *tfs4* (denominado inicialmente *tfs3b*) constituye un supuesto SST4, formado por las proteínas VirB2, VirB3, VirB4, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4 y VirD2, codificadas por los genes del mismo nombre. Se cree que este *cluster* de genes tiene capacidad de movilizarse y transferirse como isla genómica o transposón conjugativo.

Se cree que su presencia aumenta el fitness de colonización, pero su papel no está bien definido (87).

### **3.2.4.5. Otros factores de virulencia**

#### **a) *vacA* (Vacuolating Cytotoxin A)**

El gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y codifica la citotoxina VacA. Ésta es una toxina multifuncional que induce múltiples fenómenos celulares, siendo el mejor conocido la alteración de la maduración endosomal, que conlleva la vacuolización del citoplasma de las células gástricas. Además, VacA es capaz de formar canales aniónicos transmembrana, provocar la liberación del citocromo c mitocondrial,

unirse a determinados receptores celulares activando una respuesta pro-inflamatoria y activar mecanismos apoptóticos (88,89).

El gen *vacA* se estructura en 3 regiones polimórficas: región señal (s), intermedia (i) y media (m) (90,91). Cuando el gen se expresa, se produce una pro-toxina de 140 kDa que consta de una secuencia señal, un dominio *passenger* constituido por la región media y la intermedia y un dominio autotransporte que funciona como un sistema de secreción tipo V. Mediante tres escisiones proteolíticas se conforma la toxina definitiva de 88 kDa, que consta de dos dominios: p33 y p55 (89) (Figura 11).

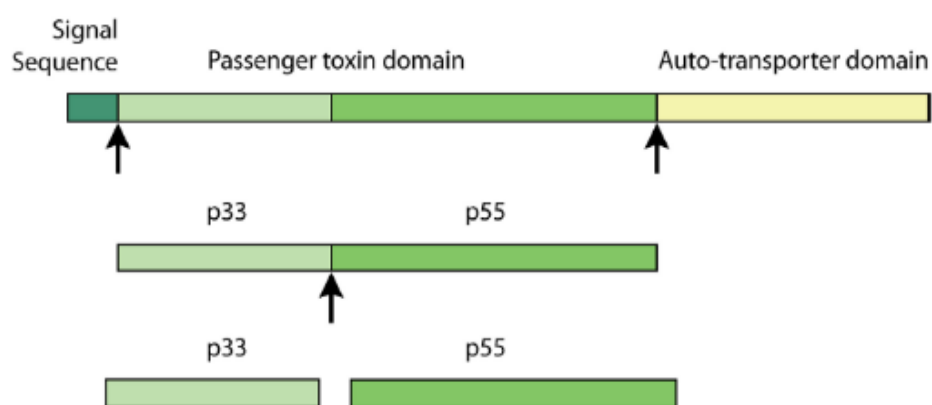


Figura 11. Estructura esquemática de la pro-toxina VacA y las escisiones proteolíticas que sufre (flechas negras) para producir los dominios p33 y p55 que forman la toxina definitiva (89).

Una vez producida, VacA puede permanecer en la superficie bacteriana o secretarse en forma de toxina de 88kDa. Los monómeros secretados de VacA se agrupan en oligómeros, pero se disocian en ambientes no neutros, aumentando la actividad citotóxica. La formación de oligómeros sobre la membrana plasmática de las células gástricas puede provocar la formación de canales anión selectivos que permiten la salida de moléculas complejas como bicarbonato y urea al medio extracelular, contribuyendo al crecimiento de *H. pylori*. VacA también presenta actividad vacuolizante (figura 12) y para ello son cruciales el dominio p33, fuertemente hidrofóbico y con motivos de dimerización transmembrana, y unos 100 aminoácidos del dominio p55, necesario para

la unión a las células del hospedador. Una vez que VacA es internalizada por la célula huésped, se traslada hasta el endosoma temprano por mecanismos dependientes de actina F. La proteína asociada a CD2 es la encargada de transferir VacA del endosoma temprano al tardío, donde se desarrolla el proceso de vacuolización, en el que intervienen las proteína syntaxina 7, la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP7), la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) y la dinamina, todas ellas necesarias para la formación y estabilidad de las vesículas (82).

Otro efecto de VacA sobre las células humanas es la inducción de la apoptosis (figura 12). Ésta se produce por la interacción de VacA con la membrana mitocondrial, reduciendo su potencial, lo que provoca la liberación del citocromo c, así como un ciclo celular desacompañado y una caída de los niveles de ATP (82). Sin embargo, hay estudios que indican que la mayoría de proteína VacA se encuentra en el interior de las vacuolas y que la apoptosis es resultado de la interacción de VacA con factores pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 más que de la unión directa de VacA a la membrana mitocondrial (92).

VacA tiene la capacidad de regular múltiples rutas celulares. Induce la producción de citocinas como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IL-10}$  e  $\text{IL-13}$ . También provoca la sobreexpresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2), la cual a su vez provoca sobreexpresión de la prostaglandina  $\text{E}_2$ . Además, por movilización de calcio intracelular, VacA es capaz de inhibir la secreción de ácido en el estómago. Dado que VacA afecta a rutas de señalización mediadas por  $\beta$ -catenina, es posible que VacA tenga un papel en la oncogénesis de *H. pylori*. También es reseñable la capacidad de VacA de producir autofagosomas y asociarse a ellos (82).

El sistema inmune del hospedador se ve modulado en presencia de VacA. Por una parte, la maduración de los fagosomas se ve alterada por la formación de megasomas, que facilitan la supervivencia de *H. pylori* en el interior de los macrófagos. También altera las rutas de presentación de antígeno por las moléculas del complejo de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) y la proliferación de linfocitos B y es capaz de entrar en los linfocitos T primarios activados o en proceso de migración, de modo que se inhibe la proliferación de los linfocitos T CD8+ (82)(figura 12).

Por la estructura de su gen, VacA es una proteína polimórfica. Los polimorfismos se encuentran en la región amino terminal de la proteína, en las regiones s, i, d, m y c (figura 13).

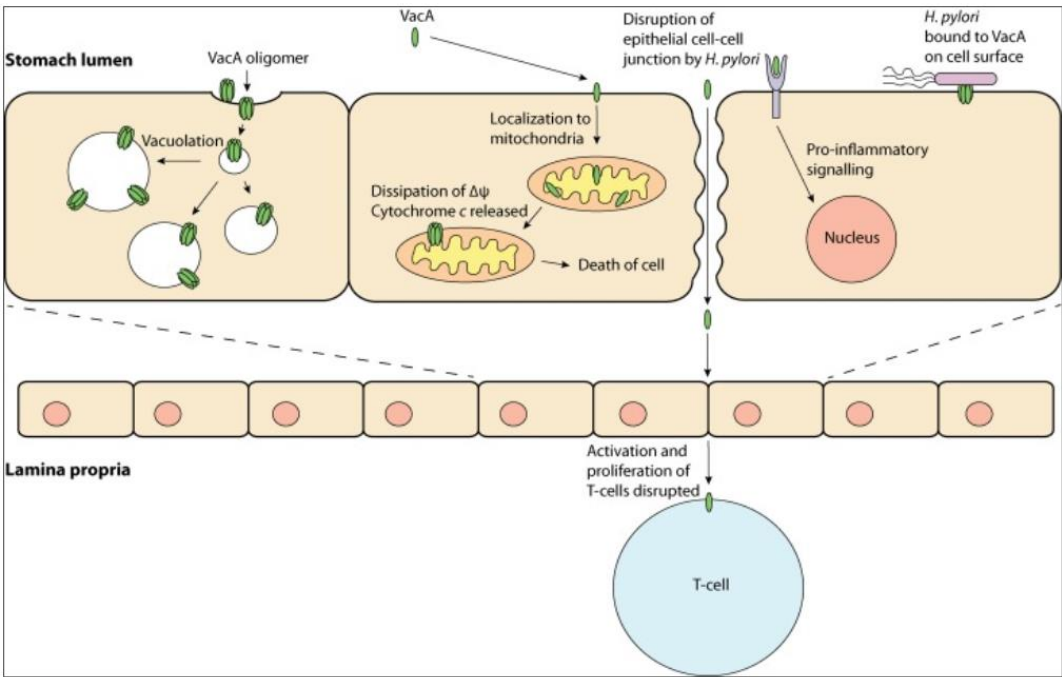


Figura 12. Resumen de los principales procesos de VacA: producción de vacuolas, apoptosis por liberación del citocromo c, inducción de inflamación e inhibición de la proliferación de linfocitos T (89).

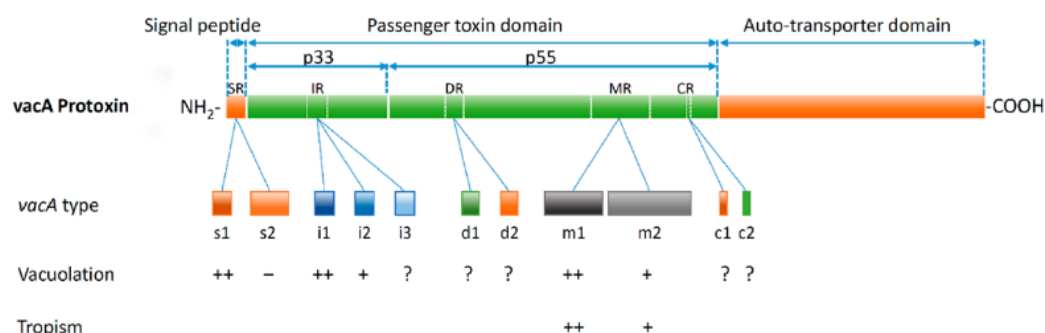


Figura 13. Estructura del gen *vacA* y los polimorfismos que pueden presentar las regiones *s*, *i*, *d*, *m* y *c* (93).

La región *s* se encuentra en la porción *p33* e influye en la actividad vacuolizante y la eficiencia de la formación del canal de aniones debido a la naturaleza hidrofóbica de los aminoácidos cercanos al sitio de escisión proteolítica. La variante *s2* sufre la escisión en un sitio alternativo respecto a *s1* que hace que su longitud aumente en 12 residuos hidrofílicos. Por lo tanto, la inserción en la membrana de la célula huésped se ve facilitada en las cepas con el alelo *s1*.

La región *m* se encuentra en la porción *p55* de la toxina e influye en el tropismo por la célula huésped, siendo el alelo *m1* tóxico para un rango mayor de células.

La región *i* se localiza entre las regiones *s* y *m*. Se describió en el año 2007 y parece el mejor indicador de gravedad de la enfermedad. Tiene 3 alelos y se considera que *i1* va asociado con mayor actividad vacuolizante y mayor gravedad.

En conjunto, se considera que las cepas que portan los alelos *s1*, *i1* y *m1* de *VacA* generan cuadros clínicos más graves (82).

Más recientemente se describieron las regiones *d* y *c*, que presentan cada una dos alelos, en función de la presencia o no de una delección. El alelo *d2* presenta una delección de 69-81pb que no está presente en el alelo *d1*. Se piensa que esta región está

relacionada con la unión de *vacA* a las células del hospedador. En el caso de la región *c*, el alelo *c1*, que se ha relacionado con riesgo de desarrollar cáncer gástrico, presenta una delección de 15pb que no está presente en el alelo *c2* (93).

### **b) IceA**

La proteína IceA (*Induced by Contact with Epithelium*) está codificada por el gen *iceA*. Este presenta dos alelos *iceA1* e *iceA2* y se ha descrito que las cepas que expresan la proteína IceA1 provocan que el paciente tenga mayor riesgo de desarrollar úlcera péptica, mientras que los pacientes infectados con cepas que producen IceA2 no tienen un riesgo aumentado (94).

### **c) Sistemas antioxidantes**

La colonización gástrica por *H. pylori* genera una fuerte respuesta inflamatoria, que lleva asociada la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNI). Para sobrevivir en estas condiciones, teniendo en cuenta la enorme toxicidad que supone el  $O_2$  para una bacteria microaerófila, *H. pylori* produce una serie de enzimas antioxidantes:

- Superóxido dismutasa (SOD): es el enzima antioxidante mejor caracterizado, presente en muchas bacterias. Cataliza la reacción de dismutación del superóxido a peróxido de hidrógeno según la reacción  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . La SOD de *H. pylori* está codificada por el gen *sodB*, consta de dos subunidades idénticas y contiene hierro.
- Catalasa: se trata de un enzima presente en muchos grupos bacterianos, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno



según la reacción  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  y se encuentra codificada por el gen *katA*. Asociada a la catalasa, aparece la proteína KapA, que aumenta la resistencia de la bacteria al  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

- Peroxirredoxinas: son proteínas ubicuas que confieren resistencia al estrés oxidativo, catalizando la reducción de hidroperóxidos orgánicos a su alcohol correspondiente, según la reacción  $\text{ROOH} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ .
- MdaB: es una NADPH quinona reductasa que se expresa en ausencia de los otros sistemas antioxidantes.
- NapA: NapA media en la activación de los neutrófilos y aumenta la producción de ROS. Sin embargo, NapA parece tener un papel protector frente al estrés oxidativo, ya que su expresión se ve aumentada si se pierden otros sistemas antioxidantes.

A pesar del repertorio enzimático, el estrés oxidativo puede llegar a dañar el ADN. Para defenderse, *H. pylori* presenta sistemas de reparación de ADN como endonucleasas para recombinación homóloga y sistema *missmatch-repair* (consistente en las proteínas MutS, MutL y MutH), entre otros. Además, para reparar el daño oxidativo de las proteínas, *H. pylori* cuenta con el enzima metionin sulfóxido reductasa (95).

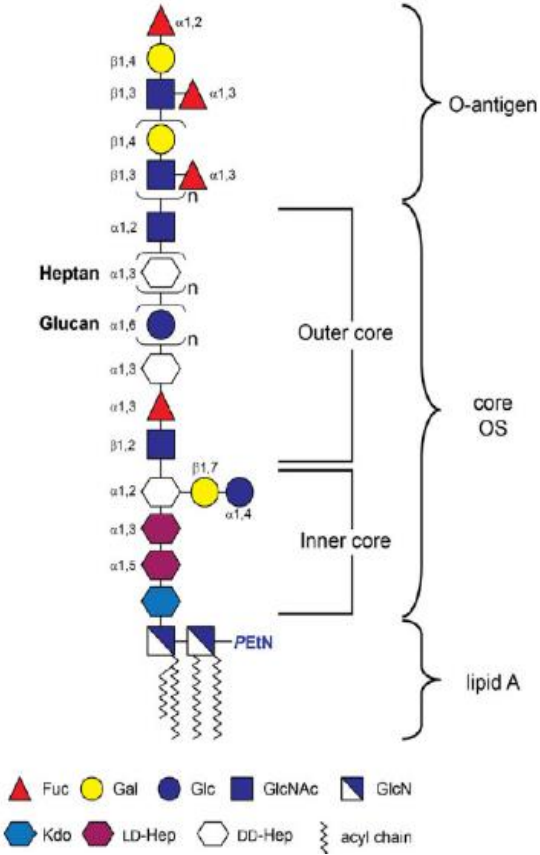
#### **d) Lipopolisacárido (LPS)**

Es un glicolípido complejo y variable presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Tiene función estructural y también de interacción con el ambiente circundante. Está compuesto de tres dominios: lípido A o endotoxina (hidrofóbico, embebido en la membrana externa, interacciona con receptores del

sistema inmune), núcleo oligosacarídico (conservado, sin repeticiones, influencia la permeabilidad de la membrana externa) y el antígeno O (polisacárido externo variable que contribuye a la antigenicidad y seroespecificidad de la molécula) (96).

En el caso de *H. pylori*, su LPS (figura 14) tiene dos características que ayudan a la persistencia gástrica de la bacteria:

- a) Mimetismo del antígeno O gracias a la unión de antígenos Lewis, lo que ayuda a la evasión de la respuesta inmune y provoca la generación de autoanticuerpos que reconocen las células parietales gástricas contribuyendo en el desarrollo de la enfermedad.



- b) Resistencia a los péptidos catiónicos antimicrobianos

(CAMPs) del huésped, gracias a la estructura modificada del lípido A, que disminuye su endotoxicidad y ayuda a evadir la respuesta inmune.

Además, el fenotipo antigénico del LPS de *H. pylori* se modifica en el transcurso de la infección en respuesta a diversos estímulos como la interacción con linfocitos T helper o el pH gástrico (97).

### e) Proteasa

Enzima que desintegra la estructura polimérica del mucus y debilita su función como barrera por la pérdida gradual de su viscosidad, lo cual aumenta la retrodifusión del ión hidrógeno.

#### 3.2.5. Epidemiología

*H. pylori* ha evolucionado con el ser humano desde los inicios del género *Homo*, hace unos 2,5 millones de años, en África (98). Desde entonces, la bacteria se ha extendido por el mundo siguiendo las migraciones humanas, lo que explica la existencia de 7 genotipos diferentes agrupados por regiones geográficas. Estas poblaciones modernas derivan de las poblaciones que surgieron inicialmente en África, Asia Central y Este asiático y posteriormente se extendieron con la colonización prehistórica de Polinesia y América, la llegada de la agricultura a Europa, la expansión bantú y el comercio de esclavos (99) (figura 15).

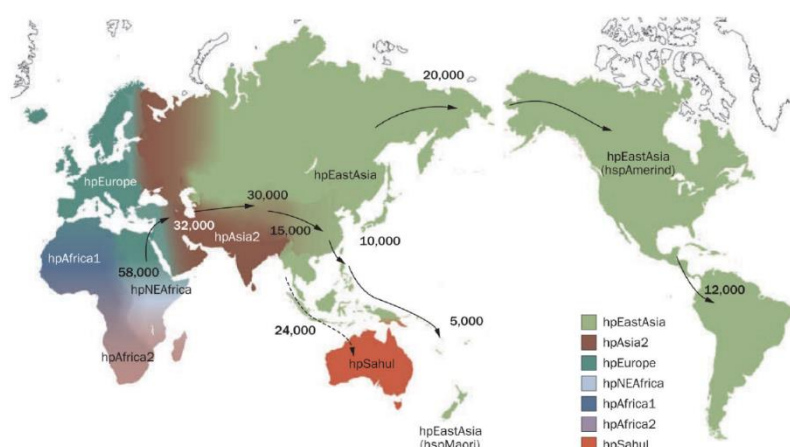


Figura 15. Mapa mundial en el que se indican con flechas los patrones globales estimados de la migración de *H. pylori* y los años estimados desde que se produjeron. La flecha discontinua indica una migración no confirmada (83).

Así, hoy en día *H. pylori* es una bacteria ubicua. Es probablemente la infección humana más frecuente (100). Se estima que infecta a más del 50% de la población adulta

en todo el mundo y es responsable del 75% de todos los cánceres gástricos (101). La mayor prevalencia de infección por *H. pylori* se encuentra en los países en vías de desarrollo, donde se calcula que el 70-80% de la población adulta está infectada, mientras que en los países con mayor desarrollo socioeconómico la cifra se estima en torno al 40-50%. La prevalencia aumenta con la edad, mientras que el sexo, la etnia, la raza, la actividad laboral y el consumo de tabaco no se encuentran relacionados con la prevalencia (100).

Dada la elevada prevalencia mundial, se ha investigado sobre un posible reservorio medioambiental. *H. pylori* permanece viable en el agua entre los 4 y 15°C, por lo que parece un factor a tener en cuenta. En cualquier caso, se sabe que el antro gástrico humano es el nicho ecológico natural de *H. pylori*, y es por ello que se considera la transmisión persona-persona como la principal. Se distinguen tres tipos:

- Fecal-oral: a través de las heces de personas infectadas o consumo de aguas contaminadas con ellas. Sería la vía más frecuente en países con bajo nivel socio-económico.
- Oral-oral: ingesta de inóculo del microorganismo con fines experimentales, por aspiración accidental de jugo gástrico infectado o tras resucitación cardiopulmonar mediante la técnica del boca a boca, donde la bacteria residiría en la placa dental y la saliva actuaría como vector. Sería la vía más frecuente en los países con elevado desarrollo socio-económico, sobre todo entre la población infantil.
- Gástrica-oral: se daría en la infancia principalmente y se produciría al entrar en contacto el vómito de una persona infectada con la cavidad oral de otra.

Además, se ha descrito la transmisión iatrogénica, por sondas, endoscopios y otros instrumentos mal desinfectados y se valora la posibilidad de que la mosca doméstica pueda actuar como vector (100).

Se han realizado muchos estudios sobre filogenia de especies bacterianas en base a *multilocus sequence typing* (MLST). Esta técnica se propuso en el año 1998 como método universal para el tipado bacteriano y consiste en analizar un grupo de fragmentos correspondientes a entre 6 y 10 genes constitutivos (*housekeeping*), asignando un número para cada alelo de cada *locus*, lo que permite construir dendrogramas en base a las diferencias. Para realizar MLST de *H. pylori*, los genes seleccionados fueron *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* y *yphC* y se considera que, debido a la elevada tasa de recombinación que presenta esta especie, todas las cepas no relacionadas epidemiológicamente son virtualmente diferentes (102). Hay que tener en cuenta que el análisis mediante MLST solo contempla entre un 0,1 y 0,2% del genoma total de la bacteria, lo que conlleva una baja resolución (103). Con la llegada de la NGS es posible disponer de secuencias de genomas completos y esto está provocando que técnicas como el MLST se vean sustituidas por el MLST basado en análisis del genoma *core* (cg-MLST) (15), entendiendo por genoma *core* o genoma núcleo el conjunto de genes presentes en todas las cepas de una especie bacteriana (104). Por lo tanto el cg-MLST es el análisis de los alelos de todos esos genes comunes. El genoma *core* junto con el genoma dispensable (los genes presentes solo en algunas cepas de una especie bacteriana) conforman el denominado pan-genoma, es decir, el conjunto total de genes pertenecientes a una especie bacteriana.

Pan-genoma = genoma *core* + genoma dispensable

### 3.2.6. Manifestaciones clínicas

A pesar de la elevada prevalencia mundial de *H. pylori* solo un pequeño porcentaje de los individuos colonizados presentarán algún tipo de sintomatología, mientras que el resto permanecerán asintomáticos de por vida, aunque su mucosa gástrica presentará signos de gastritis histológica (105,106). Se calcula que en los individuos colonizados por *H. pylori* el riesgo de desarrollar úlceras a lo largo de su vida es un 10-20% mayor y un 1-2% en el caso del cáncer gástrico distal. Las manifestaciones clínicas de *H. pylori* pueden resumirse en dos grandes grupos: aquellas que tienen carácter digestivo y aquellas que se presentan en otras partes del cuerpo.

#### 3.1.5.1. Manifestaciones clínicas digestivas

##### a) Gastritis

La colonización por *H. pylori* conduce siempre a la infiltración de la mucosa antro y el cuerpo gástrico por neutrófilos y monocitos. Se distinguen dos formas de gastritis asociadas a *H. pylori* (106):

##### **Gastritis aguda**

Se asocia con la colonización temprana por *H. pylori*. En este periodo, se presentan síntomas inespecíficos como dispepsia, náuseas o vómitos y se produce inflamación de la mucosa gástrica proximal y distal o bien pangastritis. Esta fase se asocia frecuentemente a un estado de hipocloridia que puede durar meses. No se sabe con certeza si tras esta colonización inicial puede producirse un aclaramiento espontáneo ni con qué frecuencia podría ocurrir (106).

### **Gastritis crónica**

Ocurre cuando la colonización por *H. pylori* se vuelve persistente. En este momento la bacteria debe contrarrestar el efecto negativo que el pH gástrico produce en su crecimiento y la mucosa intestinal debe enfrentar el daño que la propia bacteria y la inflamación asociada producen sobre las células parietales, secretoras de ácido. Así, los pacientes que mantienen su secreción ácida intacta presentarán gastritis en el antro gástrico, donde existen pocas células parietales, inflamación crónica inactiva y pocas bacterias superficiales. Por el contrario, aquellos pacientes con secreción ácida disminuida (ya sea por la bacteria o por cualquier otro proceso no relacionado con ésta) presentarán pangastritis con predominancia en el corpus, mayor número de bacterias (y distribuidas de modo uniforme) e inflamación activa, la cual aumenta la hipocloridia debido a que los factores inflamatorios locales, como la interleukina-1 $\beta$ , tienen un fuerte efecto supresor sobre las células parietales (106).

#### **b) Úlcera péptica**

Se consideran bajo esta denominación las úlceras gástricas o duodenales. En general, las úlceras gástricas debidas a *H. pylori* son más frecuente que las duodenales, salvo en los países occidentales, donde estas últimas son cuatro veces más frecuentes. En la década inmediatamente posterior al descubrimiento de *H. pylori* se calculó que el 95% de las úlceras duodenales y el 85% de las gástricas se debían a dicha bacteria y que las personas infectadas tienen un riesgo entre 3 y 10 veces superior de desarrollar úlcera péptica que las que no lo están. Actualmente, debido a las mejoras de diagnóstico y tratamiento de la infección por *H. pylori* en nuestro medio, unido a las mejoras socio-sanitarias, la prevalencia de la infección por *H. pylori* y las úlceras asociadas, se

encuentra en descenso. Por ello, en los países occidentales se recomienda confirmar la presencia de *H. pylori* antes de comenzar el tratamiento, mientras que en lugares con elevada prevalencia, se recomienda tratar directamente, ya que las úlceras pépticas no tratadas pueden presentar complicaciones. La más frecuente es el sangrado, que ocurre en alrededor del 15-20% de los pacientes, pero también se pueden dar casos de perforaciones. La incidencia de estas complicaciones se mantiene estable a pesar de la disminución de la prevalencia de infección por *H. pylori*, lo que parece estar relacionado con el uso extendido de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (106).

### **c) Carcinoma gástrico**

En 1992, el patólogo colombiano Pelayo Correa publicó la evolución secuencial de las lesiones gástricas que conducen desde la gastritis crónica inicial hasta el carcinoma gástrico (107). Esta secuencia se conoce actualmente como la cascada de Correa.

El primer paso de esta secuencia es la gastritis atrófica. Se da en alrededor del 50% de los pacientes infectados y consiste en la destrucción de las glándulas gástricas y su reemplazo por tejido fibroso debido a la inflamación crónica que provoca *H. pylori*. El siguiente paso se conoce como metaplasia intestinal y consiste en el cambio fenotípico de las células gástricas hacia un fenotipo intestinal. La evolución de estas lesiones conllevaría la aparición de displasia (también llamada neoplasia intraepitelial o neoplasia no invasiva), que consiste en el cambio celular tanto a nivel morfológico como arquitectónico hacia un fenotipo neoplásico, con presencia de abundantes mitosis y glándulas desestructuradas. La evolución de todas estas lesiones se puede explicar en términos de acumulación de mutaciones en el ADN de las células gástricas; sin embargo,



el último punto de la cascada requiere que las células precancerosas penetren en el estroma circundante para invadir el tejido y dar lugar al denominado carcinoma gástrico invasivo (108). Este tipo de tumor es el cuarto más frecuente en el mundo. Su incidencia ha disminuido en los países occidentales pero se mantiene elevada en determinadas zonas como el este asiático y América del Sur. Determinadas características del sistema inmune del hospedador, así como la infección por una cepa de *H. pylori* productora de CagA se encuentran entre las causas de mayor riesgo de padecer carcinoma gástrico (106).

#### **d) Linfoma gástrico del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)**

En condiciones normales, la mucosa gástrica no presenta tejido linfoide; sin embargo, el linfoma gástrico del tejido linfoide asociado a mucosa aparece prácticamente siempre asociado a la infección por *H. pylori* y las personas infectadas por *H. pylori* tienen un riesgo aumentado de desarrollar linfoma gástrico tipo MALT. Se calcula que menos del 1% por cierto de las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan linfoma gástrico tipo MALT. De ellos, el 60-80% presentan remisión del linfoma tras la erradicación de *H. pylori*, un 10% conservan enfermedad mínima residual y el resto no presentan mejoría o presentan evolución del linfoma. La presencia de la translocación t(11;18) (q21;q21) en el linfoma es un predictor de mala respuesta al tratamiento antibiótico (106).

#### **3.1.5.2. Manifestaciones clínicas extradigestivas**

Además de las manifestaciones del aparato digestivo, *H. pylori* se ha relacionado con patologías a otros niveles, principalmente a nivel metabólico y a nivel de respuesta

inmune adaptativa. El mecanismo que se postula para explicar este tipo de patologías es el siguiente: la infección crónica por *H. pylori* produce inflamación crónica de los tejidos, los factores inflamatorios (interleuquinas y factor necrosante de tumores) se secretan en el tejido inflamado y alcanzan el torrente sanguíneo provocando efectos a distancia; sin embargo, en algunos de estos casos la evidencia científica es insuficiente (109).

#### a) **Síndrome metabólico y patologías asociadas**

Se considera que una persona tiene síndrome metabólico cuando presenta al menos tres de los siguientes cinco componentes: obesidad central, hipertensión, hiperglucemia y dislipemia (tanto de triglicéridos como de colesterol).

Varios estudios han descrito asociaciones significativas entre la dislipemia y la seropositividad para *H. pylori* (110,111). Se postula que la sobreproducción de citoquinas debida a la infección puede activar la producción de ácidos grasos mediante la activación de la lipoproteína lipasa del tejido adiposo. Sin embargo, no hay conclusiones consistentes sobre si la erradicación de *H. pylori* puede revertir el estado de dislipemia (109).

En cuanto a la hipertensión, las citoquinas producidas debido a la infección por *H. pylori* podrían activar la vía simpática a través de la estimulación del hipotálamo, lo que conllevaría un aumento en la secreción de cortisol y adrenalina y por lo tanto un aumento de la presión arterial (112); sin embargo, no hay estudios de calidad que lo respalden (109).

La resistencia a la insulina es un componente importante de la diabetes mellitus tipo 2. Se ha sugerido que el lipopolisacárido de *H. pylori* activa los receptores tipo Toll

(TLRs) de macrófagos y células dendríticas, lo que provocaría que las células entrasen en una fase de ahorro energético, acumulación de grasa y, posteriormente, resistencia a la insulina (113). También se cree que las citoquinas secretadas debido a la infección por *H. pylori* podrían inhibir la acción de la insulina mediante fosforilación de residuos de serina en su receptor (114). Los estudios para tratar de establecer causalidad entre la infección por *H. pylori* y diabetes son poco consistentes, pero parece que apuntan a una implicación solo durante la infancia (109).

En cuanto a la obesidad, aunque se han intentado relacionar los cambios en los niveles de grelina y leptina (hormonas implicadas en la regulación del apetito) con la infección por *H. pylori*, no existen estudios de suficiente calidad que demuestren relación de causalidad (109).

En conjunto, la relación entre el síndrome metabólico y *H. pylori* se ha evaluado en diversos estudios. Un estudio (115) concluyó que las personas infectadas por *H. pylori* tenían un riesgo 1,5 veces superior de desarrollar síndrome metabólico y también se publicó que la hiperglucemia, la hipertensión y la dislipemia mejoraban tras la erradicación del patógeno, pero debido al diseño de los estudios (pocos participantes y de tipo transversal) no se puede establecer una relación de causalidad (109).

#### **b) Ateroesclerosis y otras patologías asociadas**

La ateroesclerosis consiste en el engrosamiento de las paredes arteriales debido a la acumulación de placa de ateroma. Esta está constituida principalmente por material lipídico y leucocitos en un estado de inflamación crónica, que podría estar reforzado por la liberación de citoquinas que provoca la infección crónica por *H. pylori*. Un estudio prospectivo durante 5 años demostró que las personas infectadas por cepas de *H. pylori*

CagA positivas tenían mayores engrosamientos de la pared carotídea y desarrollaban nuevas lesiones respecto a las personas no infectadas (116).

Por otra parte, no se ha podido demostrar de forma sólida la relación entre la infección por *H. pylori* y el infarto cardiaco isquémico o el infarto cerebral (109).

#### **c) Patologías relacionadas con la respuesta inmune adaptativa**

Dentro de este grupo, se han relacionado con la infección por *H. pylori* patologías como la tiroiditis autoinmune, la urticaria crónica y los cuadros alérgicos. Un metanálisis concluyó que la infección por *H. pylori*, especialmente CagA positivo, provocaba un riesgo 1,92 veces superior de desarrollar una tiroiditis autoinmune y, concretamente, un riesgo 4,35 veces mayor de desarrollar una tiroiditis de Grave (117). Otro metanálisis concluyó que las personas infectadas por *H. pylori* tienen un riesgo 1,36 veces superior de desarrollar urticaria crónica (118). Si bien ambos estudios cuentan con algunas limitaciones, parece que *H. pylori* juega algún papel en el desarrollo de ambas patologías. En el caso de las alergias, un metanálisis concluyó que en países occidentales existe una relación inversa entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de alergias (119), se cree que debido a que la infección crónica por *H. pylori* provoca inmunotolerancia.

#### **d) Otras patologías extra digestivas**

Un metanálisis concluyó que las personas con infección crónica por *H. pylori* presentan un riesgo aumentado de desarrollar bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (120). También se ha sugerido que la migraña podría estar

relacionada con la infección por *H. pylori* mediante la alteración del eje intestino-cerebro (121).

La infección por *H. pylori* se ha relacionado con la anemia por deficiencia de hierro de etiología desconocida, la púrpura trombocitopénica idiopática y el déficit de vitamina B12 (122). Actualmente, se recomienda buscar y erradicar *H. pylori* en los pacientes que presenten alguna de estas patologías (123).

### 3.2.7. Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori* se han dividido tradicionalmente en métodos invasivos y no invasivos. Los primeros incluyen todas aquellas pruebas que se realizan sobre biopsia gástrica obtenida mediante endoscopia (test rápido de urea, PCR, cultivo o histología). Los segundos son métodos de diagnóstico que no requieren endoscopia (serología, detección de antígeno en heces o test del aliento) (124).

La elección del método de diagnóstico depende de varios factores, tanto clínicos como económicos.

#### 3.2.7.1. Métodos invasivos

##### a) Histología

Fue el primer método utilizado para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Permite visualizar la presencia de la bacteria y además clasificar el daño tisular; sin embargo, presenta limitaciones a varios niveles: tamaño, número y zona gástrica de toma de la biopsia, métodos de tinción, tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones (IBPs), tratamiento previo con antibióticos y experiencia del patólogo. La

tinción inmunohistoquímica es la más sensible y específica, pero en la mayoría de casos es suficiente con una tinción de hematoxilina-eosina o Giemsa (124).

#### **b) Test rápido de la ureasa (RUT)**

Se trata de un método barato, rápido, sencillo de realizar, muy específico y altamente disponible. Se basa en poner de manifiesto la presencia de la enzima ureasa, producida por *H. pylori*, añadiendo un reactivo con urea sobre la biopsia gástrica. Si la enzima ureasa se encuentra presente, se produce la descomposición de urea en dióxido de carbono y amonio. Este último provoca un aumento de pH que se manifiesta como un cambio de color. La sensibilidad del RUT se encuentra en torno al 85-95% y la especificidad en torno al 95-100% (124). Para obtener resultados óptimos se recomienda obtener biopsia del cuerpo y del antro gástrico y combinarlas para realizar la prueba (125). También se recomienda dejar pasar al menos 2 semanas desde la toma de IBPs y cuatro si se ha seguido una pauta con antibióticos. Se debe tener en cuenta que las muestras con presencia de sangre aumentan la probabilidad de falsos negativos (126).

#### **c) Cultivo**

El cultivo de *H. pylori* es el método más específico, pero su sensibilidad varía entre el 85-95% y disminuye notablemente en presencia de cualquier antibiótico con actividad frente a esta bacteria. En general, se acepta como muestra válida para cultivo una biopsia de antro y, a ser posible, otra de cuerpo, pero lo ideal serían cuatro biopsias (124).

Dado que *H. pylori* es un microorganismo lábil, el transporte y procesamiento de la muestra deben realizarse lo más rápido posible, a poder ser en las siguientes 6 horas de la toma de muestra. El cultivo de *H. pylori* puede realizarse en diversos medios suplementados con factores de crecimiento, como el agar Columbia con sangre. Para evitar contaminaciones por otros microorganismos, se recomienda el uso de agares selectivos con antibióticos, como el agar Pylori. Dados los requerimientos exigentes del microorganismo y su lento crecimiento, el cultivo debe realizarse en condiciones de microarofilia, que implica 5-10% de O<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> y 80-90% de N<sub>2</sub> a 35-37°C, una humedad del 95% y una incubación de hasta 10 días antes de considerar el cultivo como negativo (124,127).

La identificación de la colonia se puede hacer por microscopia de contraste de fases o, más comúnmente, mediante tinción de Gram, junto con las pruebas de ureasa, catalasa y oxidasa, que son siempre positivas (124,127). Actualmente, el sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF, permite la identificación del microorganismo en pocos minutos.

#### **d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La introducción de la PCR en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, supuso disponer de una técnica aplicable sobre biopsia pero también sobre muestras no invasivas (heces o saliva), con una sensibilidad superior al 95% y evitando los falsos negativos en pacientes con sangrado. La PCR permite detectar en unas pocas horas bacterias que se encuentran en bajos recuentos y aunque hayan perdido su viabilidad. Además, existen PCRs comerciales que detectan simultáneamente determinadas mutaciones en genes relacionados con la resistencia a antibióticos (124).

## 3.2.7.2. Métodos no invasivos

A la hora de mejorar el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, se invirtieron muchos esfuerzos en lograr métodos diagnósticos que no requiriesen endoscopia, por las complicaciones que esta puede provocar en pacientes con comorbilidades y el elevado coste de la prueba, así como la tasa de falsos negativos atribuibles a la toma de biopsias en regiones de la mucosa gástrica donde la bacteria no se encontraba presente (124). Las técnicas que permiten realizar un diagnóstico indirecto de la infección por *H. pylori* son las siguientes:

**a) Test del aliento o *urea breath test* (UBT)**

Comenzó a utilizarse hace unos 30 años y actualmente aún es el método indirecto con mejor especificidad y sensibilidad y el más utilizado. Se basa en la actividad ureasa de *H. pylori*. El paciente ingiere urea marcada con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  que, al ser hidrolizada por la ureasa bacteriana en el estómago, genera moléculas de dióxido de carbono también marcadas. Este  $\text{CO}_2$  pasa al torrente sanguíneo y finalmente es expulsado en el proceso de respiración pulmonar, momento en el que puede ser detectado. Es un método que permite hacer seguimiento tras el tratamiento erradicador, pero hay que tener en cuenta que la presencia gástrica de otros microorganismos productores de ureasa puede generar resultados falsos positivos y que la sensibilidad y especificidad en niños son inferiores a las obtenidas en adultos (124).

**b) Detección de antígeno en heces**

Este método, con buena sensibilidad y especificidad, permite detectar antígeno de *H. pylori* presente en muestras de heces de pacientes infectados. Existen varias opciones



comerciales, pero se ha demostrado que las basadas en enzimoimmunoanálisis con anticuerpos monoclonales son las que ofrecen mejores resultados (128).

### c) Detección de anticuerpos específicos

La detección serológica de IgG específica anti *H. pylori* es una técnica rápida y barata, que permite evitar los falsos negativos que pueden provocar los sangrados en todas las demás; sin embargo, es necesario tener en cuenta que los antígenos utilizados en la técnica deben estar bien seleccionados en base a las cepas circulantes en el área geográfica correspondiente para evitar falsos negativos. También hay que tener en cuenta que ante una detección de IgG específica no es posible diferenciar entre infección actual y exposición previa, por lo que, en esos casos, sería necesario realizar otra prueba confirmatoria (124).

#### 3.2.7.3. Recomendaciones europeas

El grupo europeo para el estudio de *Helicobacter* (*European Helicobacter Study Group*) se reunió por primera vez en 1996 en Maastricht (Países Bajos) con la finalidad de aglutinar expertos en el ámbito de la infección por *H. pylori* y publicar guías y recomendaciones para su diagnóstico y manejo. La última actualización se produjo en 2012 y estas son las recomendaciones de diagnóstico que recoge (123):

- 1) Si se dispone de un test monoclonal validado, el uso de la detección de antígeno en heces es equivalente al test del aliento (1a, A).
- 2) Solo deben utilizarse test serológicos validados, debido a la variación entre las distintas opciones comerciales (1b, B).

- 3) Se puede realizar diagnóstico serológico en caso de tratamiento antibiótico reciente, medicación antisecretora, sangrado, atrofia gástrica o carcinoma gástrico (1b, B).
- 4) En pacientes tratados con IBPs, estos deben ser suspendidos 2 semanas antes de realizar cultivo, UBT, RUT o detección de antígeno en heces (1b, A). Si no es posible, se recomienda realizar detección de IgG mediante serología (2b, B).
- 5) Es importante realizar cultivo y sensibilidad antibiótica en regiones o poblaciones con elevada resistencia a claritromicina si se prevé utilizar este fármaco. Debe considerarse realizar cultivo y sensibilidad antibiótica siempre que se vaya a instaurar un tratamiento de segunda línea y siempre que un tratamiento de segunda línea haya fallado (5, D). Si no es posible realizar métodos convencionales de detección de resistencias antibióticas, se pueden utilizar métodos moleculares para detectar resistencias a claritromicina y/o fluoroquinolonas sobre biopsia gástrica (1b, A).
- 6) Cuando se cultiva *H. pylori* a partir de biopsia gástrica, el antibiograma debe incluir metronidazol (1b, A). Si la detección de resistencia a claritromicina se establece por métodos moleculares, no está justificada la realización de cultivo para detectar posibles resistencias a metronidazol (5, D).

### 3.2.8. Tratamiento

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó una lista de los patógenos para los que era prioritario encontrar y desarrollar nuevos tratamientos. Entre los patógenos con prioridad alta se encuentra *H. pylori* con resistencia a claritromicina (129).

Actualmente, hay 6 antibióticos con actividad frente a este patógeno: claritromicina, amoxicilina, metronidazol, levofloxacino, tetraciclina y rifabutina.

Se han desarrollado diferentes estrategias de tratamiento que incluyen antibióticos e inhibidores de la bomba de protones o sales de bismuto. Las principales estrategias son (130):

- Triple terapia de claritromicina: IBP más claritromicina y amoxicilina o metronidazol durante 14 días. Solo se recomienda si la resistencia a claritromicina en el entorno es inferior al 15% y no hay evidencia de exposición previa a macrólidos.
- Terapia cuádruple: IBP más bismuto, tetraciclina y metronidazol durante 10-14 días. Se recomienda en pacientes con exposición previa a macrólidos o alérgicos a penicilina.
- Terapia concomitante: IBP más claritromicina, amoxicilina y metronidazol durante 10-14 días.
- Terapia secuencial: IBP más amoxicilina durante 5-7 días seguida de otros 5-7 días de IBP más claritromicina y metronidazol.
- Terapia híbrida: IBP más amoxicilina durante 7 días seguido de otros 7 días de IBP más amoxicilina, claritromicina y metronidazol.

- Triple terapia de levofloxacino: IBP más levofloxacino y amoxicilina durante 10-14 días.
- Terapia secuencial con quinolonas: IBP más amoxicilina durante 5-7 días seguido de otros 5-7 días con IBP más fluoroquinolona y metronidazol.

El grupo europeo para el estudio de *Helicobacter* incluye las siguientes recomendaciones en la guía publicada en 2012 (123):

- La triple terapia con claritromicina debe abandonarse en las regiones con resistencias superiores al 15% salvo que se disponga de antibiograma previo.
- En áreas con baja incidencia de resistencia a claritromicina puede utilizarse la triple terapia con claritromicina como tratamiento empírico de primera línea. También puede utilizarse la cuádruple terapia con bismuto.
- En áreas con incidencia elevada de resistencia a claritromicina, se recomienda como tratamiento empírico de primera línea la cuádruple terapia con bismuto. Si el bismuto no se encuentra disponible, se recomienda terapia cuádruple sin bismuto o terapia secuencial.
- Tras un fallo terapéutico con un régimen que incluya claritromicina, se recomienda terapia cuádruple con bismuto o triple terapia con levofloxacino como tratamiento de segunda línea.
- Tras un fallo terapéutico de un régimen de segunda línea el régimen de tercera línea debe seleccionarse siempre que sea posible, en base al antibiograma.

La Sociedad Española de Gastroenterología recomienda que la primera línea de tratamiento sea una pauta cuádruple concomitante sin bismuto (IBP, amoxicilina, claritromicina y metronidazol durante 14 días) (131).

### 3.2.9. Detección de resistencias

El aumento de las resistencias antibióticas es un problema global que afecta a múltiples bacterias patógenas, entre ellas *H. pylori*. Las resistencias varían según el área geográfica y también según el grupo de edad. Se ha observado que las resistencias a metronidazol y claritromicina varían más a lo largo del tiempo y en función de la localización geográfica que las resistencias a tetraciclinas o amoxicilina. En general, se asocian los mayores porcentajes de cepas resistentes a países con peor control de uso apropiado de antibióticos, aunque hay excepciones (132). En España se han descrito, en niños, resistencias a claritromicina superiores al 50% y alrededor del 40% para metronidazol (133). También se ha descrito que el porcentaje de cepas resistentes a claritromicina suele ser mayor en niños que en adultos y al contrario para levofloxacino (132).

Por todo ello, es importante disponer de métodos fiables que permitan monitorizar las resistencias, tanto para guiar el tratamiento como para mantener un control epidemiológico que permita ajustar los regímenes de tratamiento empírico en función de las resistencias que prevalecen en cada área geográfica. Los métodos de detección de resistencias pueden ser fenotípicos o genotípicos (132).

### 3.2.9.1. Detección de resistencias por métodos fenotípicos

Se basan en el enfrentamiento de la bacteria y el antibiótico en un medio de cultivo, de modo que se pueda observar la inhibición del crecimiento del microorganismo en presencia de los diferentes antibióticos. El método recomendado es la dilución en agar, pero debido a que se trata de un método lento y laborioso, habitualmente se utiliza la determinación mediante épsilon-test. Este es el método recomendado por el *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (134) y consiste en depositar sobre una placa de agar sembrada en césped una tira plástica graduada impregnada con un gradiente del antibiótico de interés, de modo que al crecer la bacteria generará un halo de inhibición que nos permitirá determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para ese antibiótico. La interpretación de la CMI para clasificarla en las categorías clínicas de resistente, intermedio o sensible, se realiza en base a los criterios del EUCAST o bien del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (135), pero se ha de tener en cuenta que la diferencia en los puntos de corte que existen entre ambos comités puede dar lugar a interpretaciones diferentes.

Los métodos fenotípicos tienen la ventaja de ser relativamente baratos y permitir probar tantos antibióticos como se desee. Como desventaja, se necesita un cultivo viable y puro de la bacteria y no se llega a conocer cuál es el mecanismo de resistencia subyacente.

### 3.2.9.2. Detección de resistencias por métodos genotípicos

Consiste en la detección de mecanismos de resistencia a nivel molecular. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden detectar las mutaciones conocidas que se asocian a resistencia a claritromicina, levofloxacino, rifampicina y tetraciclina. Las

resistencias a metronidazol son complejas y, por el momento, no existe ningún producto comercial que permita detectarlas. Los métodos genotípicos tienen la ventaja de que no requieren viabilidad de la cepa, permiten conocer el mecanismo exacto que provoca la resistencia y, en algunos casos, pueden aplicarse directamente sobre muestra directa (sin cultivo previo). Como desventaja destaca su mayor coste y la imposibilidad de detectar todas las resistencias (132).

### 3.3. Microbioma

#### 3.3.1. Antecedentes históricos

El término microbioma, comenzó a utilizarse en los años 50 del siglo XX, entendiendo como tal el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos y protozoos) incluidos en una comunidad bacteriana.

Los estudios de microbioma tal y como los conocemos hoy en día sentaron sus bases a raíz de los estudios de Carl Woese, que hipotetizó que la maquinaria de síntesis proteica basada en RNA debió aparecer junto con las primeras formas de vida y que por lo tanto, su evolución debía presentar restricciones que evitasen cambios abruptos. Poco tiempo después, se demostró que las regiones del genoma bacteriano que codifican ARN ribosómico evolucionan unas 100 veces más despacio que aquellas que codifican proteínas. Este descubrimiento sentó las bases de la taxonomía bacteriana y trajo consigo el descubrimiento del dominio Archaea (136).

A medida que la tecnología fue avanzando, se pudo profundizar en los estudios de microbioma. En 2008 se inició el Proyecto Microbioma Humano (137), financiado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos con los siguientes objetivos:

- Desarrollar un conjunto de referencia de secuencias de genomas microbianos y realizar la caracterización preliminar del microbioma humano.
- Explorar la relación entre la enfermedad y los cambios en el microbioma humano.
- Desarrollar nuevas tecnologías y herramientas para el análisis computacional.
- Establecer un repositorio de recursos.
- Estudiar las implicaciones éticas, legales y sociales de la investigación sobre el microbioma humano.

### 3.3.2. Conceptos básicos

De cara a comprender los estudios sobre microbioma es necesario aclarar algunos conceptos clave (138,139):

- Microbiota: conjunto de microorganismos que se encuentran de forma natural formando parte de una comunidad bacteriana.
- Metagenoma: el total del material genético comprendido en una muestra. Se compone de los genomas de muchos organismos individuales.
- Microbioma: hábitat completo, incluyendo microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales que los rodean.
- Metaboloma: conjunto de moléculas de bajo peso molecular (metabolitos) presentes en una muestra biológica.
- Viroma: material genético procedente de virus presente en una muestra.
- Disbiosis: pérdida del equilibrio de una microbiota.
- Unidad taxonómica operativa (*Operational Taxonomic Unit*, OTU): conjunto de secuencias del gen ARNr 16S lo suficientemente similares para ser consideradas



un mismo taxón. Las secuencias que presentan una similitud de al menos el 97% pueden ser consideradas como pertenecientes a una misma especie bacteriana.

- Probióticos: microorganismos vivos que administrados correctamente producen un efecto beneficioso sobre la salud del receptor.
- Prebióticos: sustratos que utilizados por los microorganismos de un hospedador le confieren a este algún efecto beneficioso sobre su salud.

### 3.3.3. Generalidades sobre el microbioma humano

Se calcula que entre 500 y 1000 especies diferentes de bacterias conviven en el cuerpo humano en un momento dado. Esto implica que, en conjunto, cada ser humano tiene un número mayor de genes bacterianos que humanos, con la diversidad y plasticidad que ello conlleva (140).

A raíz del Proyecto Microbioma Humano se pudo conocer en profundidad el microbioma de 18 localizaciones del cuerpo humano en sujetos sanos y se constató que la composición y diversidad variaba entre ellas de forma notable. Las comunidades bacterianas de las heces y la cavidad oral se describieron como las más diversas, presentando variaciones a nivel de sublocalizaciones, mientras que las muestras vaginales presentaron la menor diversidad. (136)

Al comparar diferentes individuos entre sí se comprobó que el microbioma de cada localización corporal puede presentar diferencias o no entre individuos sanos. Así, el microbioma oral es muy similar entre individuos sanos, no tanto a nivel de especie, pero sí a nivel de género, pero las heces de individuos sanos pueden presentar grandes variaciones a nivel de filo. Sin embargo, se constató que a pesar de estas diferencias taxonómicas, el conjunto de rutas metabólicas presentes en los metagenomas es

prácticamente constante, lo que permite pensar en la existencia de microbiomas sanos y microbiomas enfermos (136).

### 3.3.4. Microbioma en la salud y la enfermedad

La colonización bacteriana del ser humano comienza probablemente ya en el periodo intrauterino, con el paso de microorganismos comensales a través de la placenta. Esta microbiota evoluciona tras el nacimiento a medida que se van introduciendo nuevos alimentos (141). Así, las bacterias que conforman la microbiota de individuos sanos se encargan de funciones como la síntesis de vitamina K, la digestión de compuestos indigeribles, defensa frente a colonizaciones por microorganismos patógenos y la formación de la arquitectura digestiva (142).

Ante determinadas circunstancias, como cambios en la dieta, consumo de antibióticos o privación de sueño, la microbiota puede verse alterada hasta un punto en el que se pierdan determinadas funciones necesarias para mantener un estado sano del hospedador (140).

Diversas enfermedades infecciosas han sido relacionadas con procesos de disbiosis en diferentes localizaciones corporales (142). Así, la infección por *Clostridium difficile* toxigénico responde a una disbiosis provocada por administración de antibióticos que desequilibra la microbiota intestinal permitiendo el sobrecrecimiento de *C. difficile*. La infección por *H. pylori* se ha relacionado con disbiosis de la cavidad oral que conduce a periodontitis crónica (143) y las alteraciones profundas de la microbiota vaginal se relacionan con la vaginosis bacteriana.

También se ha descrito que las alteraciones de la microbiota intestinal pueden tener repercusiones a nivel hepático. En pacientes con enfermedad hepática se produce una

disbiosis intestinal, con aumento de enterobacterias y disminución del género *Bifidobacterium*. Si en esa situación se diera una translocación bacteriana, se generaría una endotoxemia que provocaría una disfunción inmune y posterior fallo hepático (142).

A nivel de patología oncológica también se han descrito relaciones entre la microbiota y los tumores malignos del tracto gastrointestinal. Desde 1994 se reconoce a *H. pylori* como causante de cáncer gástrico y estudios recientes han descrito que *Fusobacterium nucleatum* se encuentra en proporciones muy elevadas en el intestino de pacientes con cáncer de colon (144). También se ha demostrado en modelos murinos que *F. nucleatum* se encuentra presente y viable en metástasis hepáticas procedentes de tumores de colon y que el tratamiento con metronidazol disminuye tanto el tamaño como la progresión del tumor (145).

La obesidad y la diabetes tipo 2 se han relacionado con la microbiota intestinal, cuyas variaciones podrían alterar el metaboloma sérico y generar resistencia a la insulina. También se han descrito implicaciones de la microbiota intestinal en el asma severo y las alergias alimentarias, así como en patologías tales como el trastorno de depresión severa y el trastorno del espectro autista a través del eje microbiota-intestino-cerebro (142).

### 3.3.5. Microbioma gástrico

Durante décadas se pensaba que, debido a su ambiente ácido, el estómago era una cavidad estéril en la que ningún microorganismo podía sobrevivir. A raíz del descubrimiento de *H. pylori* se cambió este paradigma y actualmente diversos estudios metagenómicos han descrito la presencia de material genético de diversas especies bacterianas en el estómago y se han descrito los géneros *Prevotella*, *Streptococcus*,

*Veillonella*, *Rothia* y *Haemophilus* como los correspondientes al microbioma *core* del estómago sano (146). Sin embargo, en función de los tipos de muestras estudiadas y la metodología utilizada los resultados varían y tampoco se ha estudiado en profundidad si dichas bacterias forman una verdadera comunidad o si se encuentran en el estómago de forma transitoria.

### 3.3.6. Estudio y análisis del microbioma

Si bien los primeros estudios de microbiota se llevaron a cabo mediante técnicas de cultivo bacteriano, con la llegada de las técnicas de secuenciación masiva se ha podido profundizar mucho más en el conocimiento del microbioma, sobre todo teniendo en cuenta que se calcula que en torno al 80% de las especies bacterianas no son cultivables pero sí pueden ser detectadas mediante técnicas moleculares.

Actualmente, la metodología más extendida es la secuenciación mediante NGS del gen ARNr 16S. Este gen codifica para el ARN ribosómico 16S y está presente en todas las especies bacterianas. Debido a la presencia de regiones constantes y variables es posible diseñar cebadores de PCR válidos para la gran mayoría de las especies bacterianas que, hibridando en una región constante del gen, permitan amplificar la región variable de elección, a partir de la cual se extrae la información taxonómica a diferentes niveles (filo, clase, orden, familia, género y, en algunos casos, especie).

A la hora de comprender la estructura de una comunidad bacteriana es necesario calcular índices de diversidad. Los dos principales tipos de diversidad son (147):

- Alfa diversidad: riqueza de especies de una comunidad considerada homogénea. Las medidas pueden realizarse de modo cualitativo o cuantitativo y basadas en el número de especies o en la diversidad

filogenética. Así, las curvas de rarefacción basadas en el número de OTUs son una medida cualitativa que representa el número de especies observadas en función del número de secuencias obtenidas. También se puede representar la divergencia filogenética (calculada a partir de la longitud de los brazos del árbol filogenético) en función del número de secuencias obtenidas. A nivel cuantitativo, el índice de Shannon es el más utilizado. Está basado en la equidad del número individuos pertenecientes a cada una de las especies presentes. Se considera más diversa aquella comunidad en la que todas las especies presentes tienen una representación similar.

- Beta diversidad: permite evaluar diferencias entre dos muestras. Al igual que en la alfa diversidad, se pueden realizar medidas cualitativas y cuantitativas y, dentro de estas, basadas en las especies observadas o bien en la divergencia entre ellas. Los cálculos basados en las especies observadas generan una información limitada, por lo que los estudios de microbioma suelen basarse en medidas relacionadas con la divergencia. En este sentido, es ampliamente utilizado en análisis UniFrac, tanto en su variante cualitativa (*unweighted*) como cuantitativa (*weighted*). Se basa en la idea de que dos comunidades deben considerarse más similares cuanto más relacionados filogenéticamente estén los taxones que forman parte de cada una de ellas, aunque dichos taxones no sean exactamente los mismos. El análisis UniFrac cualitativo solo tiene en cuenta la presencia/ausencia de los taxones mientras que el cuantitativo también valora el número de secuencias pertenecientes a cada uno de esos taxones.

## OBJETIVOS

---

## 4. OBJETIVOS

1. Comparar el genoma completo de 20 cepas de *H. pylori* aisladas a partir de biopsia de antro gástrico de pacientes pediátricos, profundizando en la producción de factores de virulencia.
2. Realizar tipado *in silico* mediante MLST de las 20 cepas de *H. pylori*, describir su pan-genoma y genoma *core*, estudiar sus relaciones filogenéticas y comparar el resultado del genoma *core* con el obtenido al añadir los genomas de referencia de los seis principales linajes geográficos.
3. Estudiar la carga bacteriana total normalizada por célula humana mediante PCR a tiempo real sobre biopsia de antro gástrico, en pacientes pediátricos colonizados y no colonizados por *H. pylori*.
4. Analizar el microbioma del antro gástrico de pacientes pediátricos colonizados y no colonizados por *H. pylori* mediante secuenciación de alto rendimiento MiSeq (Illumina) y compararlo con los datos obtenidos mediante secuenciación con 454 (Roche).
5. Describir las bacterias que se encuentran transcripcionalmente activas en la mucosa gástrica de pacientes pediátricos colonizados y no colonizados por *H. pylori* mediante secuenciación de alto rendimiento MiSeq (Illumina) sobre biopsia de antro gástrico.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Selección de pacientes y muestras

Se incluyeron en el estudio 39 pacientes pediátricos que acudieron a la consulta de Gastroenterología Pediátrica del Hospital 12 de Octubre de Madrid entre 2012 y 2016 por presentar molestias digestivas. Para todos los pacientes se recogieron los siguientes datos demográficos: fecha de nacimiento, sexo, peso, estatura y nacionalidad.

En todos los casos se sometió al paciente a gastroscopia con toma de biopsia de antro gástrico. Se realizó test rápido de la ureasa y se enviaron las muestras al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre y al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid.

En función del resultado del cultivo bacteriano de la biopsia gástrica y el resultado de la prueba de ureasa rápida, los pacientes se dividieron en dos grupos:

- Grupo *H. pylori* positivos: 28 pacientes con cultivo de biopsia gástrica positivo para *H. pylori*. De ellos, 18 se incluyeron en el estudio de genomas, 8 en el estudio de microbioma gástrico y 2 en ambos estudios.
- Grupo *H. pylori* negativos: 11 pacientes con cultivo de biopsia gástrica negativo para *H. pylori* y prueba de ureasa rápida negativa, todos ellos incluidos en el estudio de microbioma gástrico.

Los criterios de exclusión fueron:

- Haber recibido tratamiento antibiótico para la erradicación de *H. pylori* en el último mes.
- Haber recibido cualquier tratamiento antibiótico en las últimas dos semanas.

## 5.2. Transporte de las muestras

Las biopsias de antro gástrico obtenidas mediante endoscopia digestiva se recogieron en un tubo estéril.

Para los pacientes incluidos en el estudio de microbioma se recogió una segunda biopsia en un tubo estéril inmersa en solución RNeasy® (Thermo Fisher) para preservar el ARN.

Todas las biopsias se enviaron refrigeradas a 4°C al Hospital Universitario de La Princesa el mismo día de su toma, donde se procesaron para cultivo en menos de 3 horas. En caso de que no pudiese cumplirse este tiempo, las muestras fueron congeladas a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

## 5.3. Procesamiento de las muestras

### 5.3.1. Test rápido de la ureasa (TRU)

En el momento de la endoscopia se realizó el test rápido de la ureasa (TRU) con el reactivo CLOtest (Kimberly-Clark). Tras introducir la biopsia en el kit, se dejó a temperatura ambiente y se observó a las 3 horas y hasta un máximo de 24 horas para evidenciar el viraje de amarillo a rosa que indica un resultado positivo.

### 5.3.2. Histología

La evaluación histopatológica de las biopsias de antro gástrico se realizó según los procedimientos habituales: preparación de secciones histológicas y tinción con hematoxilina-eosina. El examen de todas las preparaciones histológicas fue llevado a

cabo por un patólogo que desconocía el resto de resultados diagnósticos. Se consideró una muestra positiva para *H. pylori* cuando se observaron bacilos con forma espiral. Se recogió el grado de inflamación y la patología asociada. Los resultados se informaron siguiendo la versión actualizada del sistema de Sydney (148).

### 5.3.3. Cultivo

El cultivo bacteriológico se realizó en todas las biopsias. La siembra se realizó en cabina de seguridad biológica, rotando la biopsia con ayuda de una torunda estéril sobre dos medios de cultivo comerciales:

- Placa de Agar Sangre (Columbia Agar con 5% de sangre de oveja; BioMérieux).
- Placa selectiva Agar *Pylori* (*Pylori* Agar, BioMérieux).

Tras la siembra, la biopsia se congeló a -80°C.

Ambas placas se incubaron en atmósfera microaerofílica (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) a 37°C durante 15 días, a lo largo de los cuales fueron revisadas cada 3 días para detectar el crecimiento de las colonias pequeñas y translúcidas compatibles con *H. pylori*. La identificación de estas colonias se realizó mediante las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y ureasa, así como identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker). También se confirmó la morfología característica mediante tinción de Gram.

### 5.3.4. Estudio fenotípico de sensibilidad antimicrobiana

El estudio de sensibilidad antibiótica se realizó mediante el método de difusión en tira en placa de agar sangre previamente inoculada con torunda. Se realizó incubación en condiciones de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) a 37°C. Se realizó una primera

lectura de la CMI a los 3 días y una lectura definitiva a los 5 días. Se determinó la CMI frente a los siguientes antibióticos: claritromicina, metronidazol, amoxicilina, tetraciclina, rifampicina y levofloxacino y se realizó la interpretación de acuerdo a los puntos de corte establecidos por EUCAST (tabla 1).

Antibiótico	CMI (mg/L)	
	Sensible ≤	Resistente >
Amoxicilina	0,12	0,12
Claritromicina	0,25	0,5
Levofloxacino	1	1
Metronidazol	8	8
Rifampicina	1	1
Tetraciclina	1	1

Tabla 1. Interpretación de las CMIs para *H. pylori* según criterios EUCAST.

5.4. Extracción de ácidos nucleicos y determinación de la concentración de ADN

Como paso previo a realizar las técnicas de PCR y secuenciación masiva, se llevó a cabo una extracción de ácidos nucleicos.

- Extracción a partir de cultivo:

Las 20 cepas de *H. pylori* que se incluyeron en el estudio de genomas se sometieron a extracción automatizada de ácidos nucleicos.

Se utilizó el equipo NucliSens® easyMAG™ (Biomérieux), un sistema basado en la tecnología de extracción con sílice y partículas magnéticas. El procedimiento de trabajo fue el siguiente:

- Partiendo de un cultivo en medio sólido de 48 horas, se preparó una suspensión en 200 µL de solución alcalina y se transfirió a una cubeta.

- Se preparó la mezcla sílice-calibrador (500  $\mu$ L de buffer y 550  $\mu$ L de sílice) y se adicionó a la cubeta con la muestra.

- Se realizó el procedimiento automático habitual y se obtuvo un eluido que se utilizó inmediatamente o se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- Extracción a partir de biopsia:

La extracción de ácidos nucleicos totales (ADN y ARN) se llevó a cabo en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) en Valencia (España). Se utilizó el kit *Master Pure TM Complete ADN & ARN Purification* (Epicentre).

Las biopsias inmersas en solución RNAlater, se transfirieron a un tubo eppendorf estéril. A continuación se siguió el siguiente protocolo:

1. Se añadieron 250  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas y 250  $\mu$ L de tampón de lisis y se machacó con un mortero de plástico estéril seguido de mezcla en vórtex durante 1 minuto.
2. Se añadieron a los tubos bolitas de vidrio *Pathogen Lysis Tubes* (QIAGEN) de tamaño S y L.
3. Se lisaron las células con el sistema *TissueLyzer II* (QIAGEN) durante 5 minutos y con una potencia de 30 Hz, poniendo en hielo seco las muestras durante 2 minutos y otros 2 minutos en termobloque a  $65^{\circ}\text{C}$  para descongelar. Este proceso se repitió hasta un total de tres ciclos.
4. Se añadieron 50  $\mu$ L de lisozima (20 mg/mL) y 2  $\mu$ L de lisostafina y se incubó en termobloque a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y media en agitación a 400 rpm.
5. Se añadieron 2  $\mu$ L de proteinasa K y se incubó en termobloque a  $65^{\circ}\text{C}$  durante

- 30 minutos con agitación a 400 rpm.
6. Se colocaron los tubos en hielo durante 3 minutos para parar la reacción de la proteinasa K.
  7. Manteniendo las muestras en hielo, se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de agente precipitante de proteínas (Epicentre) y se mezcló con vórtex durante 20 segundos.
  8. Se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 4°C y 13000 rpm y se separó el sobrenadante a nuevos tubos.
  9. Se añadieron 1000  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y se mezcló por inversión. Se dejaron los tubos en hielo durante 5 a 30 minutos.
  10. Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 25 minutos y se desechó el sobrenadante.
  11. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, se decantó el etanol y se dejaron los tubos abiertos en el interior de una cabina de bioseguridad para evaporar cualquier resto de etanol.
  12. Se resuspendió el sedimento en 32  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas y se dejó a 4°C toda la noche.

La concentración final de ácidos nucleicos se midió con el sistema *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit* (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante.

El contenido de cada tubo se separó en dos alícuotas: una de 10  $\mu\text{L}$  (para estudio de microbioma basado en ADN) y otra de 20  $\mu\text{L}$  (para estudio de microbioma basado en ARN).

Las alícuotas para estudio de microbioma basado en ARN se sometieron a purificación de ARN mediante el kit *RiboPure™ Bacteria Kit* (Ambion) siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) Se añadieron 2  $\mu$ L del tampón DNase I.
- 2) Se añadió 1  $\mu$ L rDNase (2ug/ $\mu$ l).
- 3) Se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
- 4) Este proceso completo se repitió tres veces.
- 5) Se añadieron 2  $\mu$ L de reactivo de inactivación de DNAsa.
- 6) Se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente realizando entre 2 y 4 mezclas por inversión.
- 7) Se centrifugaron a 10000 g durante 1 minuto y medio a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante en un tubo nuevo.

### 5.5. Estudio de la densidad bacteriana mediante PCR a tiempo real

Para valorar la presencia de bacterias en las muestras recogidas se realizó, como primera aproximación, un estudio de densidad bacteriana normalizado por célula humana. Este estudio se llevó a cabo en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) en Valencia (España).

Se realizó amplificación del gen bacteriano ARNr 16S y del gen humano codificante para la proteína actina mediante qPCR para cuantificar el número de copias de cada uno de estos genes en el ADN extraído. Las qPCR se realizaron en un equipo *LightCycler®480 Instrument II* (Roche) y los ciclos umbral (*cycle threshold*, Ct) obtenidos sirvieron para determinar el número de bacterias por célula humana utilizando rectas patrón calibradas por citometría de flujo. Se calculó el ratio ARNr 16S/actina y se comparó su valor en función del estado *H.pylori* positivo o *H. pylori* negativo mediante el test U de Mann-Whitney utilizando SPSS 15.0.

Las secuencias de los cebadores y los volúmenes de reactivos utilizados para cada uno de los genes amplificados se resumen en la tabla 2.

		Gen ARNr 16S	Gen actina humana
<b>Cebador <i>forward</i></b>		U515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'	5'-TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC-3'
<b>Cebador <i>reverse</i></b>		U789R 5'-GCGTGGACTACCAGGGTATCT-3'	5'-ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG-3'
<b>Volumen de reactivos para un volumen total de 20 µL</b>	SybrGreen	10 µL	10 µL
	Cebador F	0,4 µL	0,4 µL
	Cebador R	0,4 µL	0,4 µL
	H2O	8,2 µL	8,2 µL
	ADN	1 µL	1 µL

Tabla 2. Cebadores y volúmenes para la amplificación del gen bacteriano ARNr 16S y el gen de la actina humana.

Las condiciones de las PCRs para la amplificación de los genes ARNr 16S y actina humana se recogen en las tablas 3 y 4.

Gen ARNr 16S			
Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	10 seg	48
Hibridación	66	30 seg	
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	40	30 seg	1

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen bacteriano ARNr 16S.



Gen actina			
Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	10 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95	10 seg	48
<b>Hibridación</b>	59	30 seg	
<b>Extensión</b>	72	20 seg	
<b>Extensión final</b>	40	30 seg	1

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación del gen humano de la actina.

Las rectas patrón fueron las siguientes (tabla 5):

Gen amplificado	Recta patrón	R <sup>2</sup>
<b>ARNr 16S</b>	$Y = -3,4567x + 29,707$	0,99
<b>Actina humana</b>	$Y = -3,447x + 37,964$	0,97

Tabla 5. Rectas patrón para el gen bacteriano 16SARNr y el gen de la actina humana.

## 5.6. Secuenciación de alto rendimiento

Para realizar secuenciación masiva se utilizaron dos técnicas diferentes. La secuenciación de los genomas completos de *H. pylori* se realizó con el equipo MiSeq (Illumina), mientras que el estudio de microbiota gástrica basado en el gen ARNr 16S se realizó con los equipos MiSeq (Illumina) y 454 GS FLX Titanium chemistry (Roche).

### 5.6.1. Secuenciación mediante MiSeq (Illumina) a partir de cepa

La secuenciación de genomas completos se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología, Tumores y Biología Celular del *Karolinska Institutet* en Solna (Suecia).

Las librerías de secuenciación se prepararon utilizando el kit *TruSeq Nano DNA* (Illumina, San Diego, CA, USA) y se secuenciaron con el equipo MiSeq de Illumina v3 generando lecturas *paired-ends* de 300pb cada una.

#### 5.6.2. Secuenciación mediante MiSeq (Illumina) a partir de biopsia

La secuenciación del gen ARNr 16S a partir de biopsia gástrica se llevó a cabo en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) en Valencia (España).

Como paso previo a la secuenciación, los ácidos nucleicos extraídos se dividieron en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó para estudio de ADN y otra para estudio de ARN. Esta última se trató con DNasa, utilizando el kit *RiboPure™ Bacteria Kit* (Ambion), según las instrucciones del fabricante, y el ARN presente en la muestra se retrotranscribió a ADNc, utilizando el kit *High Capacity cDNA RT Kit* (Applied BioSystems), según las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, en ambas alícuotas, se preamplificaron mediante PCR las regiones hipervariables V1-V5 del gen ARNr 16S, con los cebadores universales 8F–AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 926R–CCGTCAATTCMTTTRAGT y se purificaron los productos resultantes empleando el kit *Nucleofast 96 PCR* (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Se construyó una librería de amplicones a partir de los productos purificados, siguiendo el protocolo de preparación de librerías de Illumina. Se utilizaron los cebadores descritos por Klindworth *et al.* (149), que generan un amplicón de aproximadamente 460 pb, que comprende las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S. Finalmente, la secuenciación se realizó en un equipo MiSeq siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el protocolo 2x300 *paired-end*.

### 5.6.3. Secuenciación mediante 454 GS FLX (Roche) a partir de biopsia

La secuenciación del gen ARNr 16S a partir de biopsia gástrica se llevó a cabo en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) en Valencia (España).

La amplificación del ADN se realizó mediante PCR anidada. En la PCR primaria se utilizaron los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 785R (5'-GGCCVGGGTATCTAATCC-3') que amplifican las regiones hipervariables V1-V4 del gen ARNr 16S. En la PCR secundaria, se utilizó el cebador 27F unido a una secuencia identificadora específica para cada muestra (*barcode*) y el cebador 785R unido a microesferas tipo Lib-L. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *Nucleofast 96 PCR* (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Finalmente, los amplicones se pirosecuenciaron en el equipo 454 GS FLX Titanium chemistry (Roche, Basel, Switzerland) utilizando 35 ng de ADN por muestra y agrupando 20 muestras por cada 1/8 de placa de pirosecuenciador.

## 5.7. Análisis bioinformático

### 5.7.1. Análisis de los genomas completos

#### 5.7.1.1. *Procesamiento preliminar de los genomas secuenciados*

El procesamiento preliminar de los genomas secuenciados se realizó en el Departamento de Microbiología, Tumores y Biología Celular del *Karolinska Institutet* en Solna (Suecia).

Una vez terminado el proceso de secuenciación de los genomas completos, se realizó el de filtrado de calidad de las secuencias utilizando la herramienta informática *TrimGalore* (Babraham Institute, Cambridge, Reino Unido). El ensamblaje de los

fragmentos secuenciados se llevó a cabo utilizando el programa informático *SPAdes* v.3.9.0 (11). La anotación de los genomas se realizó mediante el programa *PROKKA* v1.12 (12) utilizando el genoma anotado de la cepa HP26695 como referencia.

#### 5.7.1.2. Análisis de los factores de virulencia

El análisis de los factores de virulencia en términos de ausencia/presencia, se realizó con los resultados de anotación con *PROKKA* v1.12.

El análisis de los fragmentos EPIYA se llevó a cabo manualmente sobre la secuencia aminoacídica traducida a partir de la secuencia del gen *cagA* utilizando el procesador de texto *Sublime Text*. Los patrones EPIYA buscados fueron los siguientes: EPIYA, EPIYT, ESIYA, ESIYT, EPIYV, EHIYA, ELIYA, EPVYA, EPIYD, EPIYS, EPKYA, EPRYA, ETIYA, KPIYA y NPIYA. Estos patrones se clasificaron como EPIYA-A, -B, -C o -D de acuerdo a lo descrito por Xia *et al.* (150).

La clasificación alélica de los genes *babA* en sus variantes *babA1* y *babA2* y de las regiones s, m, i, d y c del gen *vacA*, así como el estudio de la presencia de los genes *iceA* y *dupA* se llevó a cabo enfrentando una base de datos de secuencias descargadas del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI frente a los genomas de las cepas en estudio. Se aceptaron como válidos los alineamientos de longitud de secuencia similar al tamaño del gen y con un porcentaje de identidad superior al 95%.

La determinación del estado activo o inactivo del gen *oipA* se llevó a cabo de forma manual según lo descrito en estudios previos (151,152).

#### 5.7.1.3. Multilocus Sequence Typing (MLST)

El análisis MLST de los genomas secuenciados se realizó mediante la herramienta virtual MLST 2.0 del *Center for Genomic Epidemiology* (153). La base de datos utilizada se encuentra disponible en la página web de *PubMLST* (154).

#### 5.7.1.4. Pan-genoma, genoma core y árbol filogenético

La base de datos de alelos pan-genómicos se realizó con la herramienta virtual *build\_PGAdb*, que permite además conocer los datos relativos al genoma core. El árbol filogenético se construyó con la herramienta virtual *build\_wgMLSTtree* (15). La representación gráfica del árbol filogenético se llevó a cabo con la herramienta virtual *iTOL* (16) utilizando como cepa de referencia la cepa HP26695, primer genoma de *H. pylori* secuenciado.

### 5.7.2. Análisis del microbioma gástrico y actividad transcripcional

El procesamiento inicial de las secuencias (eliminación de secuencias identificadoras y filtrados de calidad) se llevó a cabo en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) en Valencia (España).

El análisis de las secuencias filtradas se llevó a cabo utilizando la plataforma informática QIIME v 1.8.0 (8). Las secuencias que presentaron similitudes iguales o superiores al 97% se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) utilizando el comando `pick_open_reference_otus.py` para generar la tabla de OTUs y el árbol filogenético que permiten realizar los análisis de diversidad. Las secuencias presentes en el blanco se restaron en las muestras de forma individual.

#### 5.7.2.1. Análisis de la alfa diversidad

El análisis de alfa diversidad se realizó mediante la plataforma QIIME v 1.8.0 (8). Para estimar la diversidad microbiana se realizó una rarefacción a 1200 secuencias por muestra en los datos obtenidos de la plataforma 454 (Roche) y a 10000 secuencias por muestra en los datos obtenidos mediante MiSeq (Illumina). El análisis de la alfa diversidad se realizó en base a tres medidas diferentes (distancia filogenética, número de OTUs observadas y valor del índice de Shannon) tras agrupar las secuencias según procediesen de biopsias de pacientes *H. pylori* positivos o negativos.

El análisis estadístico de la alfa diversidad basada en distancia filogenética y número de OTUs se realizó con el programa QIIME mediante análisis de permutaciones de Montecarlo. El análisis estadístico del índice de Shannon entre ambos grupos se realizó mediante un test T de Student para dos muestras utilizando el programa SPSS 15.0.

#### 5.7.2.2. Análisis de la beta diversidad

El análisis de la beta diversidad se realizó mediante la plataforma QIIME v 1.8.0 software (8) tanto de forma cuantitativa (*Weighted Unifrac*), como de forma cualitativa (*Unweighted Unifrac*) entre cada par de muestras y realizando el Análisis de Componentes Principales (ACP o PCA, *Principal Component Analysis*).

La significación de los agrupamientos obtenidos en la beta diversidad se analizó por medio del test ANOSIM (*Analysis of Similarity*), también utilizando la plataforma QIIME v 1.8.0.

#### 5.7.2.3. *Análisis taxonómico*

El análisis taxonómico se realizó mediante la plataforma QIIME v 1.8.0 software (8) utilizando el comando `summarize_taxa.py`, que permite obtener una tabla de la frecuencia relativa y absoluta para cada uno de los niveles taxonómicos siguientes: filo, clase, orden, familia y género.

Las representaciones gráficas se realizaron con el programa informático *Excel* (Microsoft).

#### 5.7.2.4. *Análisis de la actividad transcripcional*

Como medida indirecta de la actividad transcripcional de los microorganismos presentes en las biopsias de antro gástrico, se definió el ratio de actividad (RA): número de secuencias de ARN dividido entre el número de secuencias de ADN para cada uno de los niveles taxonómicos.

## RESULTADOS

---



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características clínico-demográficas de los pacientes

Para llevar a cabo este estudio, se obtuvieron biopsias de antro gástrico de 39 pacientes pediátricos. Las principales características demográficas se recogen en la siguiente tabla (tabla 6):

Características (n=39)		
Edad media en años (rango)		11,4 (3-18)
Sexo	Masculino (%)	19/39 (49)
	Femenino (%)	20/39 (51)
Nacionalidad	Española (%)	35/39 (90)
	No española (%)	4/39 (10)
Índice de masa corporal (IMC)	Infrapeso (IMC <18,5) (%)	24/39 (62)
	No infrapeso (IMC >18,5) (%)	14/39 (36)
	Sin datos (%)	1/39 (2)
Hallazgos histológicos	Inflamación (%)	26/39 (67)
	No inflamación (%)	7/39 (18)
	Sin datos (%)	6/39 (15)
Cultivo <i>Helicobacter pylori</i>	Positivo (%)	28/39 (72)
	Negativo (%)	11/39 (28)

Tabla 6. Características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.

De los pacientes de nacionalidad no española, 2 procedían de Ecuador, 1 de Colombia y 1 de Perú.

Del total de las biopsias y las cepas de *H. pylori* obtenidas de estos 39 pacientes, 20 cepas se incluyeron en el estudio sobre genomas completos y 21 biopsias en el estudio de microbioma. En total, 2 pacientes participaron en los dos estudios simultáneamente. En las tablas 7 y 8 se describen los datos demográficos correspondientes a los pacientes de cada estudio.

Los datos detallados para cada uno de los participantes se describen en la tabla 9.

Características genomas (n=20)		
Edad media en años (rango)		12,2 (8-18)
Sexo	Masculino (%)	10/20 (50)
	Femenino (%)	10/20 (50)
Nacionalidad	Española (%)	20/20 (100)
	No española (%)	0/20 (0)
Índice de masa corporal (IMC)	Infrapeso (IMC <18,5) (%)	15/20 (75)
	No infrapeso (IMC >18,5) (%)	4/20 (20)
	Sin datos (%)	1/20 (5)
Hallazgos histológicos	Inflamación (%)	14/20 (70)
	No inflamación (%)	0/20 (0)
	Sin datos (%)	6/20 (30)
Cultivo <i>Helicobacter pylori</i>	Positivo (%)	20/20 (100)
	Negativo (%)	0/20 (0)

Tabla 7. Características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de genomas de *H. pylori*.

Características microbioma (n=21)		
Edad media en años (rango)		10,8 (3-17)
Sexo	Masculino (%)	11/21 (52)
	Femenino (%)	10/21 (48)
Nacionalidad	Española (%)	17/21 (81)
	No española (%)	4/21 (19)
Índice de masa corporal (IMC)	Infrapeso (IMC <18,5) (%)	10/21 (48)
	No infrapeso (IMC >18,5) (%)	11/21 (52)
Hallazgos histológicos	Inflamación (%)	14/21 (67)
	No inflamación (%)	7/21 (33)
Cultivo <i>Helicobacter pylori</i>	Positivo (%)	10/21 (48)
	Negativo (%)	11/21 (52)

Tabla 8. Características clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de microbioma.

ID	Estudio	Sexo	Edad (años)	Cultivo <i>H. pylori</i>	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Nacionalidad	Resultados histológicos
ES-07	Genoma	M	9	Positivo	16,60	Española	ND
ES-10	Genoma	M	11	Positivo	15,56	Española	ND
ES-11	Genoma	F	12	Positivo	15,40	Española	ND
ES-12	Genoma	M	13	Positivo	13,27	Española	ND
ES-13	Genoma	M	12	Positivo	17,85	Española	ND
ES-15	Genoma	M	11	Positivo	15,18	Española	ND
ES-25	Genoma	F	9	Positivo	20,24	Española	GSAA
ES-26	Genoma	F	14	Positivo	30,30	Española	GSAA
ES-27	Genoma	F	16	Positivo	18,47	Española	GSAA
ES-31	Genoma	F	8	Positivo	15,97	Española	GSAA
ES-46	Genoma	F	11	Positivo	17,59	Española	GSAA
ES-54	Genoma	F	13	Positivo	17,34	Española	GSAA
ES-58	Genoma	M	13	Positivo	15,25	Española	GSAA
ES-60	Genoma	F	11	Positivo	18,26	Española	GSAA
ES-610	Genoma	M	10	Positivo	26,16	Española	GSAA
ES-76	Genoma	M	15	Positivo	18,17	Española	GSAA
ES-DO	Genoma	F	14	Positivo	14,78	Española	GSAA
ES-SN	Genoma	F	15	Positivo	ND	Española	GSAA
ES-61/23	Genoma/ Microbioma	M	11	Positivo	16,62	Española	GSAA
ES-68/21	Genoma/ Microbioma	M	18	Positivo	24,81	Española	GSAA
9	Microbioma	M	11	Negativo	17,45	Española	Gastritis y MALT
10	Microbioma	M	13	Negativo	21,47	Española	Gastritis
11	Microbioma	F	10	Negativo	14,67	Española	Gastritis
12	Microbioma	F	8	Negativo	18,84	Española	Gastritis
13	Microbioma	M	12	Negativo	17,03	Peruana	Normal
14	Microbioma	M	16	Negativo	23,70	Española	Normal
15	Microbioma	M	11	Negativo	12,50	Española	Gastritis
16	Microbioma	M	12	Negativo	31,59	Española	Normal
17	Microbioma	M	3	Negativo	16,91	Española	Normal
18	Microbioma	M	13	Negativo	22,37	Colombiana	Normal
19	Microbioma	F	5	Negativo	15,14	Española	Normal
20	Microbioma	F	13	Positivo	25,40	Española	Gastritis
22	Microbioma	F	12	Positivo	23,61	Española	Gastritis
24	Microbioma	F	9	Positivo	14,99	Española	Gastritis
25	Microbioma	F	5	Positivo	25,07	Española	Gastritis
26	Microbioma	F	14	Positivo	22,58	Española	Gastritis
27	Microbioma	M	11	Positivo	20,52	Ecuador	Gastritis
28	Microbioma	F	7	Positivo	16,81	Española	Gastritis
29	Microbioma	F	14	Positivo	17,30	Ecuador	Normal

Tabla 9. Características clínico demográficas de los pacientes. ND: datos no disponibles. GSAA: gastritis superficial activa antral.

6.2. Sensibilidad antibiótica de las cepas secuenciadas

El estudio de sensibilidad a amoxicilina, claritromicina, rifampicina, levofloxacino, tetraciclina y metronidazol mediante épsilon-test (E-test) generó los resultados que se muestran en la tabla 10. En total 18/20 (90%) cepas resultaron sensibles a amoxicilina, 8/20 (40%) a claritromicina, 14/20 (70%) a rifampicina, 19/20 (95%) a levofloxacino, 20/20 (100%) a tetraciclinas y 12/20 (60%) a metronidazol. En conjunto, 5/20 (25%) cepas fueron sensibles a todos los antibióticos probados y 13/20 (65%) presentaron resistencia o sensibilidad disminuida a uno o más fármacos de primera elección.

Cepa	Antibiótico					
	AMX	CLA	RIF	LEV	TET	MET
ES-07	0,023 S	12 R	4 R	0,38 S	0,125 S	>235 R
ES-10	<0,016 S	16 R	0,75 S	0,19 S	0,064 S	24 R
ES-11	<0,016 S	0,047 S	0,75 S	0,094 S	0,064 S	2 S
ES-12	0,023 S	0,125 S	0,38 S	0,125 S	0,125 S	0,19 S
ES-13	0,016 S	4 R	0,5 S	0,19 S	0,064 S	0,25 S
ES-15	0,032 S	4 R	0,125 S	0,064 S	<0,016 S	0,25 S
ES-25	0,016 S	0,016 S	2 R	0,25 S	<0,016 S	<0,016 S
ES-26	0,032 S	0,016 S	3 R	0,047 S	<0,016 S	<0,016 S
ES-27	<0,016 S	0,5 I	1 S	0,25 S	<0,016 S	<0,016 S
ES-31	<0,016 S	0,75 R	0,5 S	0,125 S	<0,016 S	>256 R
ES-46	0,19 R	4 R	4 R	0,125 S	0,023 S	0,75 S
ES-54	0,094 S	<0,016 S	0,5 S	0,25 S	0,25 S	192 R
ES-58	0,047 S	8 R	1,5 R	0,25 S	0,19 S	0,38 S
ES-60	0,125 S	8 R	1 S	0,125 S	0,25 S	>256 R
ES-61	0,064 S	<0,016 S	0,5 S	0,032 S	0,19 S	0,125 S
ES-610	1.5 R	6 R	0,75 S	>32 R	0,064 S	96 R
ES-68	0,016 S	6 R	3 R	0,125 S	0,125 S	0,023 S
ES-76	0,016 S	16 R	1 S	0,125 S	<0,016 S	>256 R
ES-DO	<0,016 S	0,016 S	0,5 S	0,38 S	0,016 S	0,38 S
ES-SN	0,023 S	0,023 S	1 S	0,19 S	0,125 S	64 R

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI, ug/mL) de las cepas estudiadas para amoxicilina (AMX), claritromicina (CLA), rifampicina (RIF), levofloxacino (LEV), tetraciclina (TET) y metronidazol (MET) e interpretada según EUCAST como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R).

### 6.3. Análisis de genomas completos

Los 20 genomas de *H. pylori* estudiados tienen las siguientes características (tabla

11):

Cepa	Nº de contigs	Tamaño (pb)	Nº CDS	Nº señales peptídicas	Nº ARNr	Nº ARNt	Nº ARNtm
ES-07	15	1576320	1494	91	2	36	1
ES-10	21	1603109	1504	96	2	36	1
ES-11	30	1601921	1478	90	2	36	1
ES-12	33	1624498	1513	95	2	36	1
ES-13	21	1545602	1464	89	2	36	1
ES-15	28	1586324	1497	92	2	36	1
ES-25	22	1612520	1508	93	2	36	1
ES-26	26	1612520	1514	98	2	36	1
ES-27	31	1589405	1491	92	2	36	1
ES-31	18	1599281	1501	94	2	36	1
ES-46	36	1643069	1554	91	2	36	1
ES-54	36	1659412	1545	106	2	36	1
ES-58	24	1622338	1524	91	2	36	1
ES-60	22	1580782	1490	91	2	36	1
ES-61	39	1658552	1545	101	2	36	1
ES-610	25	1623048	1533	89	2	37	1
ES-68	15	1587850	1481	92	2	36	1
ES-76	30	1620093	1512	102	2	36	1
ES-DO	27	1615924	1521	85	2	36	1
ES-SN	30	1621502	1507	89	2	36	1

Tabla 11. Características de los genomas secuenciados.pb: pares de bases, CDS: región codificante (coding sequence), ARNr: ARN ribosómico, ARNt: ARN transferente, ARNtm: ARN transferente mensajero.

El tamaño medio de los genomas estudiados fue de 1609204 pb, con un rango entre 1545602 y 1658552 pb. El número medio de regiones codificantes fue de 1509, con un rango entre 1464 y 1554 regiones codificantes. El número medio de señales peptídicas fue de 93, con un rango entre 85 y 102.

6.3.1. Factores de virulencia

Se analiza en este apartado la ausencia o presencia de los principales factores de virulencia en cada una de las cepas estudiadas.

6.3.1.1. Factores de virulencia que permiten la superveniencia en condiciones

ácidas: Ureasa

Todas las cepas tienen presentes los genes *ureA*, *ureB*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH*, *ureI*, así como la metalochaperona *hypA* (tabla 12).

El sistema de dos componentes ArsRS que controla la transcripción del *cluster* de genes de la ureasa de forma ácido dependiente está presente en todas las cepas excepto en ES-SN que no tiene anotado el componente *arsS*. Sin embargo, al enfrentar mediante la herramienta BLAST del NCBI, el genoma de la cepa ES-SN frente a la secuencia anotada como *arsS* en otro genoma, que presentaba una longitud de 1332 pb, se encontró una secuencia de 1262 pb con una homología del 96%.

	ES-07	ES-10	ES-11	ES-12	ES-13	ES-15	ES-25	ES-26	ES-27	ES-31	ES-46	ES-54	ES-58	ES-60	ES-61	ES-610	ES-68	ES-76	ES-DO	ES-SN
<i>ureA</i>																				
<i>ureB</i>																				
<i>ureE</i>																				
<i>ureF</i>																				
<i>ureG</i>																				
<i>ureH</i>																				
<i>ureI</i>																				
<i>hypA</i>																				
<i>arsS</i>																				
<i>arsR</i>																				

Tabla 12. Presencia (cuadro azul) o ausencia (cuadro blanco) de los genes que codifican para las proteínas que componen la ureasa en cada cepa de *H. pylori* estudiada.

### 6.3.1.2. Factores de virulencia que permiten la movilidad: Flagelos

Todas las cepas presentan todos los genes descritos en la introducción relacionados con el funcionamiento y la estructura flagelar (tabla 13).

	ES-07	ES-10	ES-11	ES-12	ES-13	ES-15	ES-25	ES-26	ES-27	ES-31	ES-46	ES-54	ES-58	ES-60	ES-61	ES-610	ES-68	ES-76	ES-DO	ES-SN
<i>flaA</i>																				
<i>flaB</i>																				
<i>flaE</i>																				
<i>rpoN</i>																				
<i>flgR</i>																				
<i>flgS</i>																				
<i>flhA</i>																				
<i>motA</i>																				
<i>motB</i>																				
<i>rpoD</i>																				
<i>flgE</i>																				
<i>flgK</i>																				
<i>flgM</i>																				
<i>flgL</i>																				
<i>fliA</i>																				
<i>rpoN</i>																				
<i>flgS</i>																				
<i>flgR</i>																				

Tabla 13. Presencia (cuadro azul) o ausencia (cuadro blanco) de los genes que codifican las proteínas que componen los flagelos de *H. pylori* en cada una de las cepas estudiadas.

### 6.3.1.3. Proteínas exteriores de membrana (OMPs) que permiten la adhesión a las células diana

La presencia o ausencia en cada cepa de las OMPs estudiadas se muestra en la siguiente tabla (tabla 14):

	ES-07	ES-10	ES-11	ES-12	ES-13	ES-15	ES-25	ES-26	ES-27	ES-31	ES-46	ES-54	ES-58	ES-60	ES-61	ES-610	ES-68	ES-76	ES-DO	ES-SN
<i>babA</i>																				
<i>babB</i>																				
<i>babC</i>																				
<i>hopQ</i>																				
<i>sabA</i>																				
<i>sabB</i>																				
<i>alpA/hopC</i>																				
<i>alpB/hopB</i>																				
<i>oipA/hopH</i>	ON	ON		ON	OFF			OFF	ON	ON		ON			ON			ON		ON
<i>homA</i>																				
<i>homB</i>																				
<i>homC</i>																				
<i>homD</i>																				
<i>hopZ</i>																				

Tabla 14. Presencia (cuadro azul) o ausencia (cuadro blanco) de los genes codificantes para varias proteínas de membrana externa (OMPs) en cada una de las cepas de *H. pylori* estudiadas. En el gen *oipA* se indica el estado ON/OFF del gen.

Al analizar la presencia de los genes *babA*, *babB* y *babC* se detectaron 10 cepas con presencia del gen *babA*, 12 cepas con presencia del gen *babB* y 4 cepas con presencia del gen *babC*. Además, 3 cepas presentaron simultáneamente los genes *babA* y *babB*, 2 cepas los genes *babB* y *babC* y otras 2 cepas los genes *babA* y *babC*.

Mediante análisis con BLAST se trató de diferenciar entre las variantes *babA1* y *babA2*. Se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 15):



Cepa	Resultado	% identidad	Longitud del alineamiento (pb)
ES-07	<i>babA1</i>	90,9	1269
ES-12	<i>babA1</i>	93,1	1263
ES-25	No concluyente		
ES-26	No concluyente		
ES-27	No concluyente		
ES-54	<i>babA2</i>	90,4	1262
ES-58	No concluyente		
ES-61	<i>babA2</i>	90,4	1268
ES-68	No concluyente		
ES-SN	<i>babA1</i>	92.81	1294

Tabla 15. Resultado del análisis mediante BLAST para diferenciar las variantes *babA1* y *babA2*.

Las cepas con resultado no concluyente presentaban longitudes de alineamiento por debajo de los 1000pb.

Todas las cepas estudiadas presentaron los genes *sabA* y *hopQ*, mientras que el gen *sabB* estuvo presente solo en tres de las cepas estudiadas.

Los genes *alpA* y *alpB* se detectaron en todas las cepas estudiadas.

Todas las cepas estudiadas presentaron el gen *oipA*. Se analizó el estado activo o inactivo del gen en función del número de repeticiones CT presentes en su extremo inicial. Los resultados para cada cepa fueron los siguientes (en negrita secuencia que marca el inicio de la región de repeticiones CT, en azul las repeticiones CT y en rojo la timidina que debe quedar en pauta de lectura para que el gen se considere activo):

- ES-7: 9 repeticiones CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAA

- ES-10: 6 repeticiones CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAAC

- ES-11: Gen incompleto
- ES-12: 6 repeticiones CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAAAGGAAT

- ES-13: 7 repeticiones CT. Estado inactivo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAA

- ES-15: Gen incompleto
- ES-25: Gen incompleto
- ES-26: 7 repeticiones CT. Estado inactivo.

ATGAAAAAGGCCCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAAC

- ES-27: 8 repeticiones CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTTTTACTCTCTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAAAGGAAT

- ES-31: 6 repeticiones CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAAT

- ES-46: Gen incompleto
- ES-54: 5+2 CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCCCTCTTACTCTCTCTCTTTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAAC

- ES-58: Gen incompleto
- ES-60: Gen incompleto
- ES-61: 5+2 CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCCCTCTTACTCTCTCTCTTTCTCTCGTTTGGCTCCACGCTGAAAGGAAC

- ES-68: Gen incompleto
- ES-76: 1+9 CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAA

- ES-610: Gen incompleto

- ES-DO: Gen incompleto
- ES-SN: 1+6 CT. Estado activo.

ATGAAAAAAGCTCTCTTA<sup>CT</sup>AACTCTCTCTCTCTCG<sup>T</sup>TCTGGCTCCACGCTGAAAGGAAC

En conjunto, el número de repeticiones CT varía entre 6 y 10. Nueve cepas presentan configuración activa, de las cuales tres presentan 6 repeticiones CT, dos presentan 5+2 CT, una presenta 9 CT, una presenta 1+9 CT y una presenta 1+6 CT. Las dos cepas con estado inactivo presentaron 7 repeticiones CT. En 9 cepas no se pudo determinar el estado del gen por presentar una secuencia génica incompleta.

Todas las cepas estudiadas presentaron los genes *homA*, *homC* y *homD*; sin embargo en ninguna de ellas se anotó el gen *homB*.

El gen *hopZ* se anotó en todas las cepas estudiadas.

#### 6.3.1.4. Factores de virulencia tipo SST4

##### 6.3.1.4.1. Isla *cagPAI* y motivos EPIYA de *CagA*

De las 20 cepas estudiadas, en cuatro se obtuvo anotación para el gen *cagA*, marcador de la isla de patogenicidad *cagPAI*. De estas cuatro cepas *cagA* positivas, tres presentaron los 7 genes descritos como imprescindibles para el funcionamiento del sistema de secreción tipo IV, mientras que en la cepa ES-12 no se encontraron los genes *cagX* ni *cagV* (ver tabla 16). Además, no se encontró anotación para los genes *cagα*, *cagβ* ni *cagγ* en ninguna de las cepas estudiadas.

	ES-07	ES-10	ES-11	ES-12	ES-13	ES-15	ES-25	ES-26	ES-27	ES-31	ES-46	ES-54	ES-58	ES-60	ES-61	ES-610	ES-68	ES-76	ES-DO	ES-SN
cagA																				
cagZ																				
cagX																				
cag3																				
cagM																				
cagI																				
cagC																				
cagT																				
cagV																				
cagE																				
cagH																				
cagN																				
cagU																				
cagW																				
cagY																				
cagL																				
cagα																				
cagβ																				
cagF																				
cagγ																				

Tabla 16. Presencia (cuadro azul) o ausencia (cuadro blanco) de los genes codificantes para las proteínas que conforman el SST4 cagPAI en cada una de las cepas de *H. pylori* estudiadas.

Al analizar las secuencias de la proteína CagA de las cuatro cepas *cagA* positivas para localizar los fragmentos EPIYA, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Cepa ES-54: motivo EPIYA tipo -BC. En la secuencia aminoacídica de la proteína que se muestra a continuación se pueden observar, en morado, una secuencia perteneciente al segmento A sin motivo EPIYA, seguida del motivo B, en azul, al que le faltan los aminoácidos TGQAASPE previos al motivo EPIYT. En amarillo se señala el motivo C.

KELNAKLGNNNNNNNGLENSTEPIYTVQAKKVKAKIDQLNQASGFGGVGQAGFPLKRHDKVD  
DLSKVGRSVSPPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDLKVGSLREQELTQKIDNLNQAVSEAKTCYFN

- CEPA 61: motivo EPIYA tipo -BC. En la secuencia aminoacídica de la proteína que se muestra a continuación se pueden observar, en morado, una secuencia perteneciente al segmento A sin motivo EPIYA, seguida del motivo B, en azul, al que le faltan los aminoácidos TGQAASPE previos al motivo EPIYT. En amarillo se señala el motivo C.

KELNAKLGNNNNNNNGLENST EPIYTQVAKKVKAKIDQLNQAASGFGGVGQAGFPLKRHDKVD  
DLSKVGRSVSP EPIYA TIDDLGGP FPLKRHDKVDDL SKVGLSREQELTQKIDNLNQAVSEAKTCHFD

- Cepa ES-SN: motivo EPIYA tipo ABC. En la secuencia aminoacídica de la proteína que se muestra a continuación se pueden observar el motivo A en morado, el B en azul y el C en amarillo.

KELNEKFKNFNNNNNGLKNST EPIYAKVNKKKTGQAASPE EPIYTQVAKKVTQKIDQLNQAASGF  
GGVGQAGFPLKRHDKVDDL SKVGRSVSP EPIYA TIDDLGGP FPLKRHDKVDDL SKVGRSRGQELA

- Cepa ES-12 motivo EPIYA tipo ABC → En la secuencia aminoacídica de la proteína que se muestra a continuación se pueden observar el motivo A en morado, el B en azul y el C en amarillo.

KELNAKLGNFNNNNNGLKN EPIYAKVNKKKAGQAASPE EPIYQVAKKVNKIDRLNQIASGLG  
GVGRAAGFPLKRHDKVDDL SKVGLSASP EPIYA TIDDLGGP FPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQKLAQ

Las cuatro cepas presentan una configuración de motivos EPIYA tipo occidental, con presencia de segmentos tipo C. Los fragmentos A y B también tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a cepas con segmentos C. En tres de las cepas, el segmento B presenta un motivo EPIYT en lugar de EPIYA.

6.3.1.4.2. ComB cluster

Al analizar el *cluster* ComB que forma del sistema de secreción tipo IV, se observa que todos los genes que lo componen están anotados en todas las cepas, a excepción de *comB7* que no es imprescindible para el funcionamiento del sistema de secreción. También los genes *recA*, *dprA*, *comE* y *comH* están presentes en todas las cepas (tabla 17)

	ES-07	ES-10	ES-11	ES-12	ES-13	ES-15	ES-25	ES-26	ES-27	ES-31	ES-46	ES-54	ES-58	ES-60	ES-61	ES-610	ES-68	ES-76	ES-DO	ES-SN
<i>comB10</i>																				
<i>comB2</i>																				
<i>comB3</i>																				
<i>comB4</i>																				
<i>comB8</i>																				
<i>comB9</i>																				
<i>comB7</i>																				
<i>recA</i>																				
<i>comH</i>																				
<i>dprA</i>																				
<i>comE</i>																				

Tabla 17. Presencia (cuadro azul) o ausencia (cuadro blanco) de los genes que codifican para las proteínas que componen el SST4 ComB en las cepas de *H. pylori* estudiadas.

6.3.1.4.3. Sistemas de secreción tipo IV tfs3a y tfs3b

Se buscaron los genes codificantes para las proteínas que componen los SST4 tfs3 (antiguo tfs3a) y tfs4 (antiguo tsf3b) (84). De ellas, solo presentaban anotaciones los genes *virB4*, *virB8*, *virB11* y *virB4-like*, de acuerdo a lo que se muestra en la siguiente tabla (tabla 18):

	ES-07	ES-10	ES-11	ES-12	ES-13	ES-15	ES-25	ES-26	ES-27	ES-31	ES-46	ES-54	ES-58	ES-60	ES-61	ES-610	ES-68	ES-76	ES-DO	ES-SN
<i>virB4</i>																				
<i>virB8</i>																				
<i>virB11</i>																				
<i>virB4-like</i>																				
<i>dupA</i>																				
<i>virB9</i>																				
<i>virB10</i>																				
<i>virD4</i>																				
<i>virD2</i>																				

Tabla 18. Presencia (cuadro azul) o ausencia (cuadro blanco) de los genes que codifican para las proteínas que componen los SST4 *tfs3* y *tfs4*.

El gen *dupA* no se encontró anotado en ninguna de las cepas estudiadas. Se realizó un BLAST utilizando una secuencia de *dupA* disponible en el NCBI y se encontraron alineamientos con longitudes menores de las esperadas en las cepas ES-26, ES-31, ES-54, ES-61 y ES-68. La longitud aproximada del gen *dupA* es de 1900 pb. Las longitudes de los alineamientos obtenidos estuvieron en todos los casos por debajo, aunque cercanos, a dicho tamaño (tabla 19):

Cepa y contig	Secuencia	% identidad	Longitud del		E-value	Bit-score
			alineamiento			
ES-26_contig2	AB196363.1	96,63	1838		0,0	2936
ES-31_contig7	AB196363.1	96,84	1203		0,0	1965
ES-31_contig7	AB196363.1	97,33	561		0,0	993
ES-54_contig19	AB196363.1	96,55	1796		0,0	2936
ES-61_contig21	AB196363.1	96,55	1796		0,0	2936
ES-68_contig2	AB196363.1	97,93	1207		0,0	2109
ES-68_contig2	AB196363.1	95,54	561		0,0	914

Tabla 19. Resultados del análisis mediante BLAST para el gen *dupA*.

Cabe destacar que las cepas que presentaron homología con *dupA* son aquellas que presentaron anotados los genes *virB4* y/o *virB4-like*.

6.3.1.5. Otros factores de virulencia

6.3.1.5.1. Gen *vacA*

Los diferentes tipos de gen *vacA* clasificados mediante BLAST en función de los alelos presentes en sus regiones s, m, i, d y c se recogen a continuación (tabla 20):

Cepa	Region s	Region m	Region i	Región d	Región c
ES-07	s2	m2	i2	d2	c2
ES-10	s2	m2	i2	d2	c2
ES-11	s2	m2	i2	d2	c2
ES-12	s1	m2	i1	d1	c2
ES-13	s2	m2	i2	d2	c2
ES-15	s2	m2	i2	d2	c2
ES-25	s2	m2	i2	d2	c2
ES-26	s2	m2	i2	d2	c2
ES-27	s2	m2	i2	d2	c2
ES-31	s2	m2	i2	d2	c2
ES-46	s2	m2	i2	d2	c2
ES-54	s1	m2	i2	d2	c2
ES-58	s2	m2	i2	d2	c2
ES-60	s2	m2	i2	d2	c2
ES-61	s1	m2	i2	d2	c2
ES-610	s2	m2	i2	d2	c2
ES-68	s2	m2	i2	d2	c2
ES-76	s2	m2	i2	d2	c2
ES-DO	s1	m2	i2	d1	c2
ES-SN	s1	m1	i1	d1	c1

Tabla 20. Resumen de los alelos de las regiones s, m, i, d y c del gen *vacA* para cada cepa de *H. pylori*.

La mayoría de las cepas estudiadas (15/20) presentan la configuración s2m2i2d2c2, relacionada con menor virulencia, mientras que una única cepa (ES-SN)



presentó la configuración s1m1i1d1c1, relacionada con mayor virulencia. Cuatro cepas presentaron configuraciones de alelos mixtas.

#### 6.3.1.5.2. Gen *iceA*

Ninguna cepa anotó el gen *iceA*. Al realizar un BLAST frente a las tres secuencias de *iceA* disponibles en el NCBI se observa que 7 cepas presentan alineamientos de una longitud esperada (en torno a 900pb) con porcentajes de similitud entre el 88 y el 90% (tabla 21).

Cepa y contig	% identidad	Longitud del alineamiento	E-value	Bit score
ES-7_contig3	89,99	929	0,0	1082
ES-10_contig3	90,06	946	0,0	1106
ES-12_contig4	90,27	925	0,0	1110
ES-25_contig7	89,93	953	0,0	1142
ES-31_contig5	90,26	924	0,0	1110
ES-68_contig3	88,68	945	0,0	1033
ES-DO_contig5	90,49	925	0,0	1132

Tabla 21. Resultados del análisis mediante BLAST para el gen *iceA*.

#### 6.3.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

De las 20 cepas analizadas, solo las cepas ES-15 y ES-27 se pudieron asociar a un MLST ya descrito, el ST-159 (figuras 16-20). El resto de cepas dieron como resultados nuevos STs.

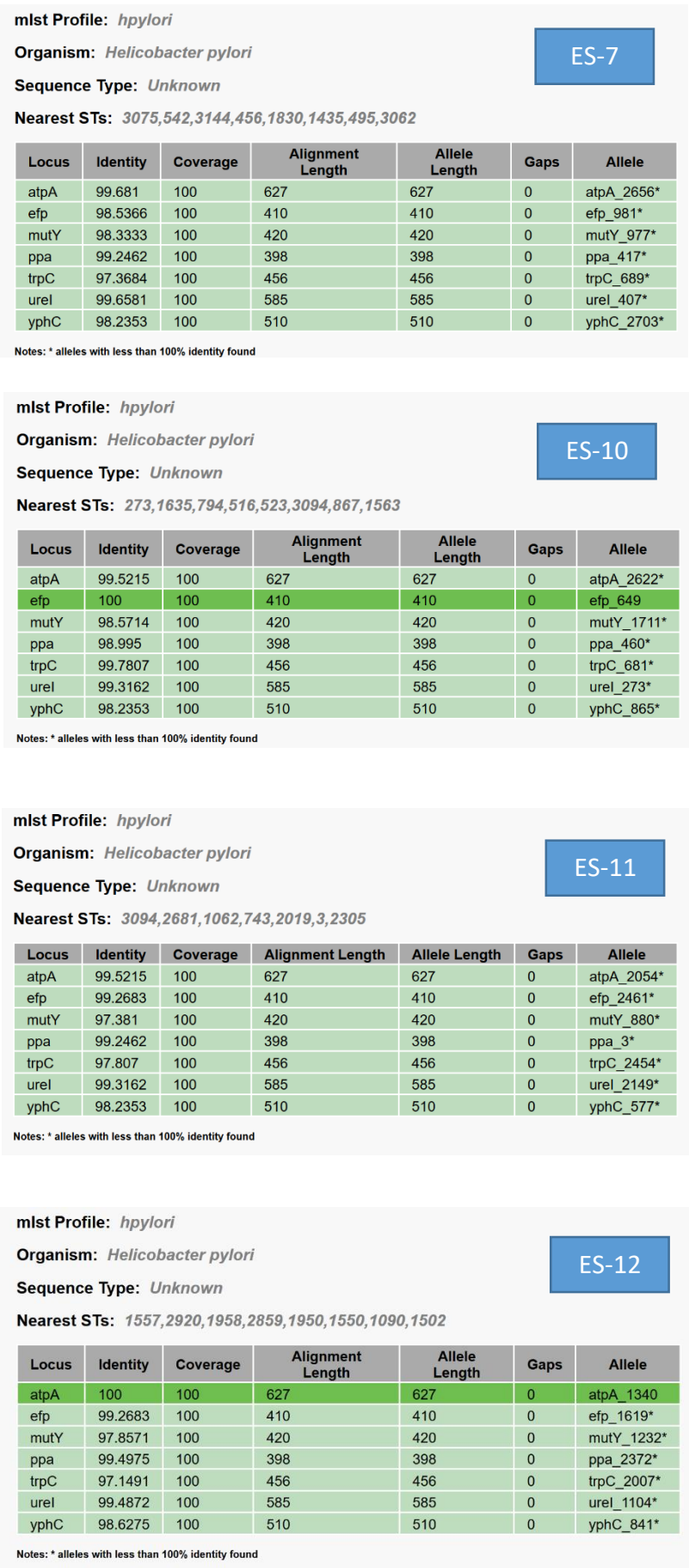


Figura 16. Perfiles MLST para las cepas ES-07, ES-10, ES-11 y ES-12 de *H. pylori*.

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-13

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 2965,2985,176,1577,1557,2895,2877,2871,637

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.681	100	627	627	0	atpA_696*
efp	99.5122	100	410	410	0	efp_2404*
mutY	98.0952	100	420	420	0	mutY_176*
ppa	98.7437	100	398	398	0	ppa_2383*
trpC	96.7033	99.7807	455	456	0	trpC_1083?*
ureI	98.9744	100	585	585	0	ureI_1664*
yphC	97.8431	100	510	510	0	yphC_942*

Notes: ?\* alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-15

Sequence Type: 159

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	100	100	627	627	0	atpA_159
efp	100	100	410	410	0	efp_159
mutY	100	100	420	420	0	mutY_159
ppa	100	100	398	398	0	ppa_159
trpC	100	100	456	456	0	trpC_159
ureI	100	100	585	585	0	ureI_159
yphC	100	100	510	510	0	yphC_159

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-25

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs:

1187,256,177,2910,2878,465,1517,1081,205,2692,131,428,92,1281,1618,1373,2877,1316,164,2901,775

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	98.8836	100	627	627	0	atpA_2413*
efp	99.0244	100	410	410	0	efp_92*
mutY	98.5714	100	420	420	0	mutY_1504*
ppa	100	100	398	398	0	ppa_131
trpC	96.7105	100	456	456	0	trpC_2575*
ureI	99.3162	100	585	585	0	ureI_1171*
yphC	98.6275	100	510	510	0	yphC_1141*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-26

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 2373,1335,1352,1862,3022,134,807

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.5215	100	627	627	0	atpA_2560*
efp	98.5366	100	410	410	0	efp_134*
mutY	99.2857	100	420	420	0	mutY_1103*
ppa	98.995	100	398	398	0	ppa_2066*
trpC	96.7105	100	456	456	0	trpC_673*
ureI	99.4872	100	585	585	0	ureI_714*
yphC	98.6275	100	510	510	0	yphC_1598*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

Figura 17. Perfil MLST para las cepas ES-13, ES-15, ES-25 y ES-26 de *H. pylori*.

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: 159\*

ES-27

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	100	100	627	627	0	atpA_159
efp	100	100	410	410	0	efp_159
mutY	99.7619	100	420	420	0	mutY_159*
ppa	100	100	398	398	0	ppa_159
trpC	100	100	456	456	0	trpC_159
ureI	100	100	585	585	0	ureI_159
yphC	100	100	510	510	0	yphC_159

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: Unknown

Nearest ST: 135

ES-31

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	100	100	627	627	0	atpA_135
efp	100	100	410	410	0	efp_135
mutY	98.3333	100	420	420	0	mutY_1700*
ppa	100	100	398	398	0	ppa_135
trpC	100	100	456	456	0	trpC_135
ureI	100	100	585	585	0	ureI_135
yphC	100	100	510	510	0	yphC_135

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: Unknown

Nearest STs: 1212,2777,1054,549,1818,2442,161,1211,2441,2445,2866,2431,2453,158,3131,1947

ES-46

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	100	100	627	627	0	atpA_667
efp	99.5122	100	410	410	0	efp_1095*
mutY	98.8095	100	420	420	0	mutY_158*
ppa	99.2462	100	398	398	0	ppa_727*
trpC	97.1491	100	456	456	0	trpC_422*
ureI	99.8291	100	585	585	0	ureI_1008*
yphC	98.4314	100	510	510	0	yphC_2570*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: Unknown

Nearest STs: 1107,1458,2552,2487,134,207,2075,2380,1799

ES-54

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	97.9233	99.8405	626	627	0	atpA_908?*
efp	98.2927	100	410	410	0	efp_327*
mutY	97.619	100	420	420	0	mutY_1827*
ppa	98.995	100	398	398	0	ppa_563*
trpC	96.4912	100	456	456	0	trpC_2339*
ureI	99.4872	100	585	585	0	ureI_134*
yphC	98.6275	100	510	510	0	yphC_207*

Notes: ? alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

Figura 18. Perfil MLST para las cepas ES-27, ES-31, ES-46 y Es-54 de *H. pylori*.

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-58

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 3215,3020,2860,1601,1555,2372,2956,2850,3214,1566,2849,3217,2111,2344,413

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.362	100	627	627	0	atpA_68*
efp	98.7805	100	410	410	0	efp_1449*
mutY	98.3333	100	420	420	0	mutY_696*
ppa	98.995	100	398	398	0	ppa_2373*
trpC	99.1228	100	456	456	0	trpC_2172*
ureI	99.3162	100	585	585	0	ureI_1103*
yphC	98.6301	100	511	510	1	yphC_2654*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-60

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 1881,1487,1398,1829,3144,1965,3406,1337,1358

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.681	100	627	627	0	atpA_2656*
efp	98.7805	100	410	410	0	efp_1220*
mutY	98.0998	99.7619	421	420	2	mutY_764?*
ppa	99.2462	100	398	398	0	ppa_1275*
trpC	98.2456	100	456	456	0	trpC_1021*
ureI	99.4872	100	585	585	0	ureI_1643*
yphC	97.8431	100	510	510	0	yphC_1822*

Notes: ?\* alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-61

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 1555,2075,2552,1799,1458,2380,1107,2487,207

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	97.9233	99.8405	626	627	0	atpA_908?*
efp	98.2927	100	410	410	0	efp_327*
mutY	97.619	100	420	420	0	mutY_1827*
ppa	98.7437	100	398	398	0	ppa_563*
trpC	96.4912	100	456	456	0	trpC_2339*
ureI	99.3162	100	585	585	0	ureI_1103*
yphC	98.6275	100	510	510	0	yphC_207*

Notes: \*? alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

mlst Profile: *hpylori*Organism: *Helicobacter pylori*

ES-68

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 2422,1137,2423,3155,3015,2011,3153,3231,2770,2852

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.2026	100	627	627	0	atpA_1650*
efp	99.5122	100	410	410	0	efp_1993*
mutY	99.5238	100	420	420	0	mutY_2113*
ppa	98.4925	100	398	398	0	ppa_2542*
trpC	98.9035	100	456	456	0	trpC_2616*
ureI	99.4872	100	585	585	0	ureI_2258*
yphC	98.0392	100	510	510	0	yphC_2548*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

Figura 19. Perfil MLST para las cepas ES-58, ES-60, ES-61 y ES-68 de *H. pylori*.



mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 2423,2257,495,1513,780,1094,1002,1214,1529

ES-76

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.2013	99.8405	626	627	0	atpA_6837*
efp	99.5122	100	410	410	0	efp_628*
mutY	98.0952	100	420	420	0	mutY_1282*
ppa	99.4975	100	398	398	0	ppa_670*
trpC	97.807	100	456	456	0	trpC_1290*
ureI	99.4872	100	585	585	0	ureI_2258*
yphC	98.2353	100	510	510	0	yphC_600*

Notes: ?\* alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 2738,1480,131,1569,1667,256,3069,134,1499

ES-610

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.2026	100	627	627	0	atpA_444*
efp	99.5122	100	410	410	0	efp_1272*
mutY	99.0476	100	420	420	0	mutY_131*
ppa	99.2462	100	398	398	0	ppa_134*
trpC	97.8022	99.7807	455	456	0	trpC_468?*
ureI	98.9744	100	585	585	0	ureI_2546*
yphC	98.2353	100	510	510	0	yphC_2710*

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 1386,1626,3022,2394,204,652

ES-DO

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.8405	100	627	627	0	atpA_2560*
efp	99.0244	100	410	410	0	efp_204*
mutY	98.5714	100	420	420	0	mutY_2161*
ppa	98.4925	100	398	398	0	ppa_832*
trpC	98.0263	100	456	456	0	trpC_691*
ureI	99.4872	100	585	585	0	ureI_607*
yphC	98.2353	100	510	510	0	yphC_693*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

mlst Profile: *hpylori*

Organism: *Helicobacter pylori*

Sequence Type: *Unknown*

Nearest ST: 218

ES-SN

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpA	99.5215	100	627	627	0	atpA_1280*
efp	100	100	410	410	0	efp_218
mutY	98.8095	100	420	420	0	mutY_638*
ppa	98.995	100	398	398	0	ppa_2423*
trpC	99.7807	100	456	456	0	trpC_218*
ureI	99.8291	100	585	585	0	ureI_227*
yphC	98.0392	100	510	510	0	yphC_1706*

Notes: \* alleles with less than 100% identity found

Figura 20. Perfil MLST para las cepas ES-76, ES-610, ES-DO y ES-SN de H. pylori.

### 6.3.3. Pan-genoma y genoma *core*

Al analizar el pan-genoma de las 20 cepas secuenciadas con un porcentaje mínimo de identidad del 95%, se obtuvieron, de un total de 4386 genes, 1068 genes (24%) pertenecientes al genoma *core*, 1341 genes dispensables (31%) y 1977 genes únicos (45%) (figura 21).

Si se analiza el genoma *core* con condiciones más estrictas (presencia de los genes en más del 99% de las cepas), el número de genes que lo constituyen disminuye hasta 1003.

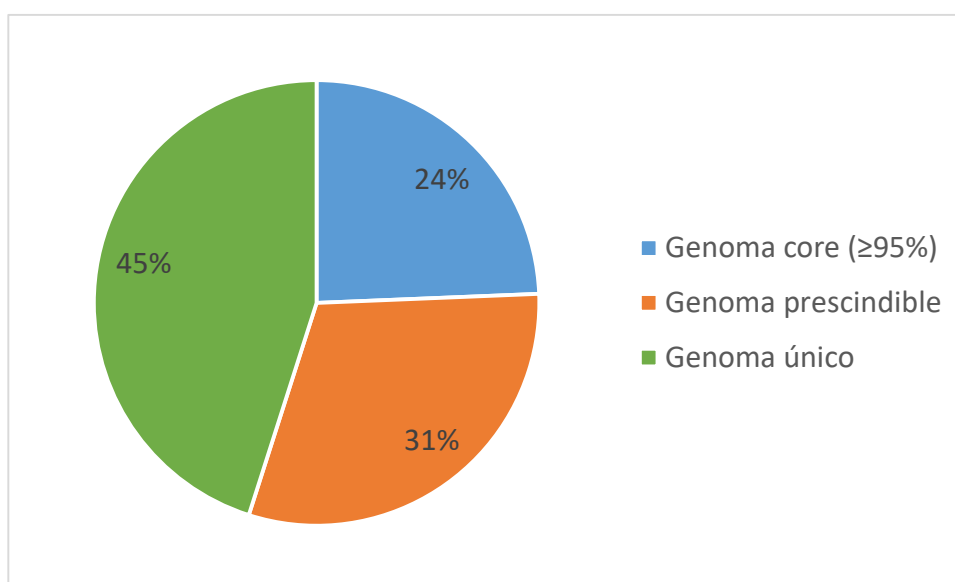


Figura 21. Representación del genoma *core*, genoma prescindible y genoma único con un porcentaje mínimo de identidad del 95% para las 20 cepas de *H. pylori* estudiadas.

Al analizar el pan-genoma de las 20 cepas secuenciadas añadiendo las 6 cepas de referencia de diferente procedencia geográfica (*H. pylori* J99 hpAfrica1, SouthAfrica7 hpAfrica2, Cuz20 hspAmerind, India7 hpAsia2, 35A hspEAsia y 26695 hpEurope) el número total de genes asciende a 6253. El genoma *core* supone 957 genes (15%), el prescindible 1584 genes (25%) y el único 3712 (59%) (figura 22).

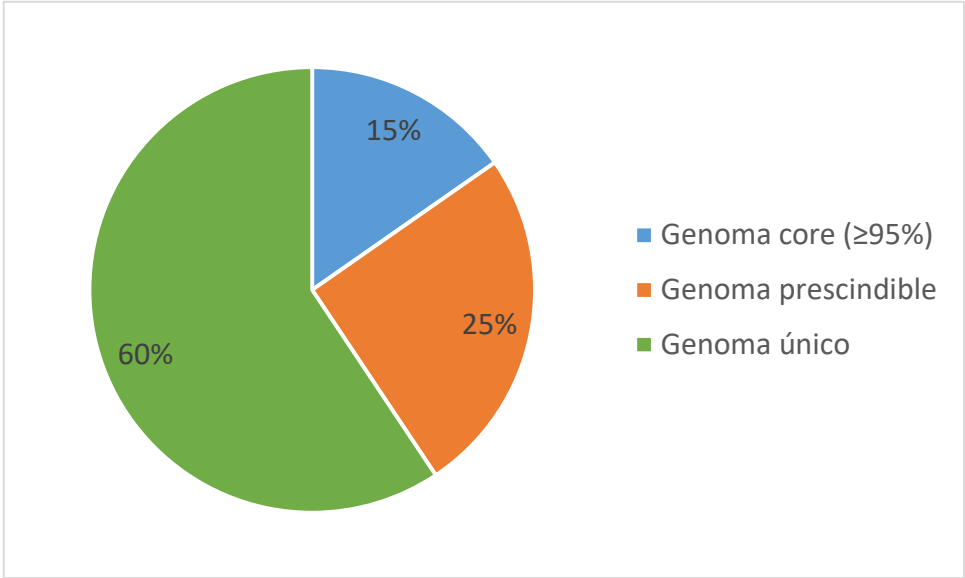


Figura 22. Representación del genoma core, genoma prescindible y genoma único con un porcentaje mínimo de identidad del 95% para las 20 cepas de *H. pylori* estudiadas y las 6 cepas de referencia.

6.3.4. Árbol filogenético

Se estudió la relación filogenética de las diferentes cepas utilizando los datos del genoma completo (figura 23) y añadiendo la representación gráfica de ausencia o presencia de los principales factores de virulencia, así como los datos clínico-demográficos más importantes de los pacientes.

Se observa que las cepas ES-54, ES-61, ES-SN y ES-12 agrupan de acuerdo al status *cagA* positivas junto con la cepa de referencia HP26695. Las cepas ES-54, ES-61 y ES-SN tienen los genes necesarios para que el SST4 desempeñe su función y para que se forme el pilus (*cagZ*, *cagX*, *cagY*, *cag3*, *cagM*, *cagI*, *cagC*, *cagT*, *cagV*, *cagE*), mientras que ES-12 no tiene los genes *CagV* ni *CagX*.



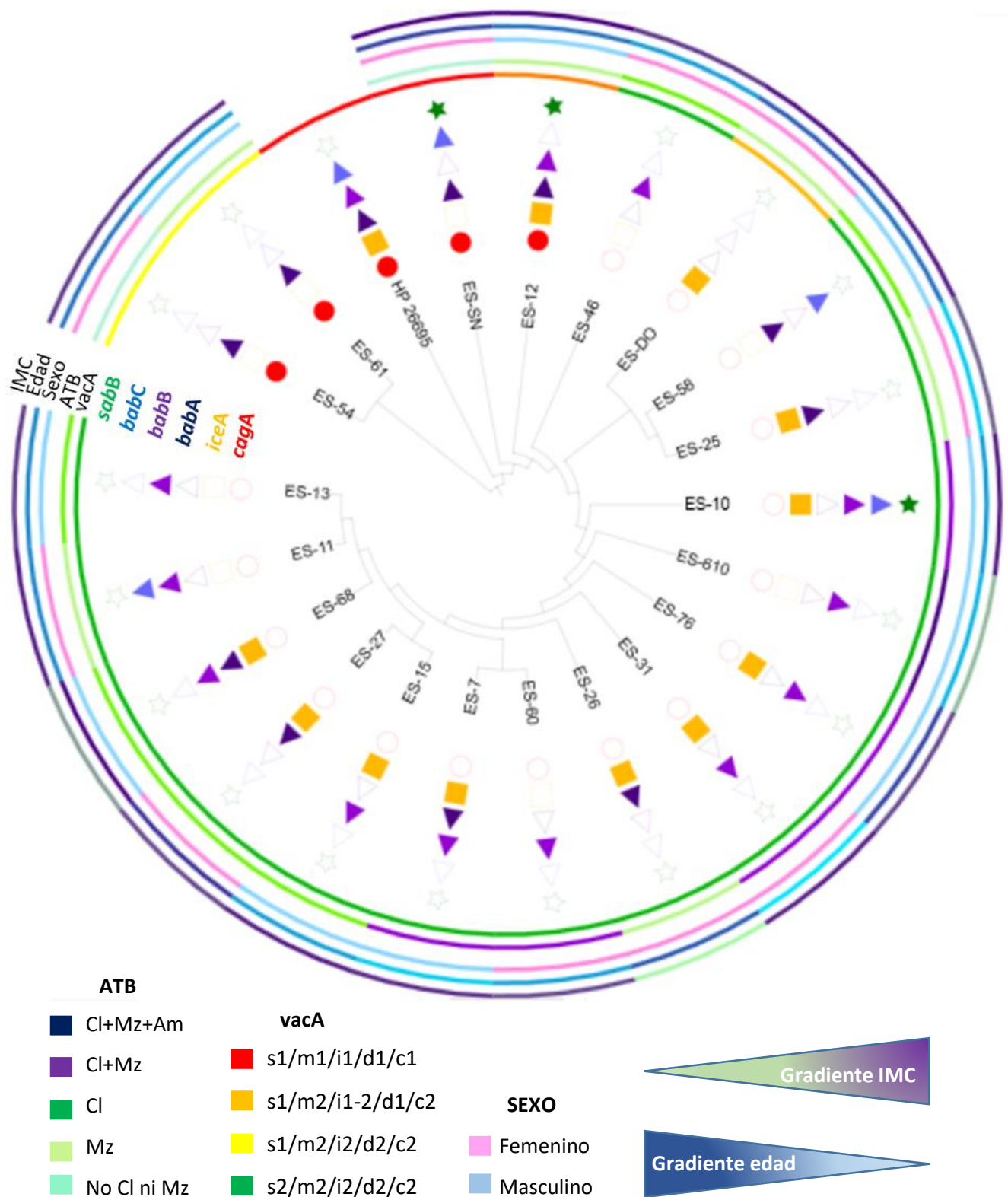


Figura 23. Árbol filogenético. Se representan las relaciones filogenéticas entre las 20 cepas analizadas en función de su genoma core. Se muestran la presencia (icono relleno) o ausencia (icono vacío) de *cagA*, *iceA*, *babA*, *babB*, *babC* y *sabB*. También se señalan los alelos del gen *vacA*, la edad, el índice de masa corporal (IMC), el sexo y la resistencia antibiótica (ATB) a claritromicina (Cl), metronidazol (Mz) y amoxicilina (Am).

Las cepas ES-54 y ES-61, que agrupan conjuntamente, tienen la característica de presentar el alelo *babA2* del gen *babA*, además de ser ambas *cagA* positivas.

También se observa una relación inversa entre la detección de resistencias a antimicrobianos y la presencia de alelos de tipo 1 en las diferentes regiones del gen *vacA*; es decir, las cepas que presentan resistencia a más antibióticos son aquellas con un perfil alélico de *vacA* menos virulento.

6.4. Microbioma

6.4.1. Densidad bacteriana en función del estado de *H. pylori*

Mediante PCR a tiempo real del gen ARNr 16S se detectaron bacterias en todas las biopsias, tanto *H. pylori* positivas como *H. pylori* negativas. El ratio mediano ARNr 16S/actina, es decir el número de bacterias normalizado por célula humana y en función del estado de *H. pylori* se muestra en la tabla 22:

Estado <i>H. pylori</i>	N	Ratio mediano ARNr 16S/actina (RI)	p-valor
<i>H. pylori</i> negativo	10	0,38 (2,85)	<0,001
<i>H. pylori</i> positivo	10	16,35 (28,11)	

Tabla 22. Ratio mediano ARNr 16S/actina (RI) en función del estado *H. pylori*.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes. Los pacientes *H. pylori* positivos tienen una proporción entre células bacterianas y células humanas superior a la de los pacientes *H. pylori* negativos.

6.4.2. Microbioma gástrico: análisis mediante MiSeq (Illumina)

El número de secuencias obtenidas por medio de la secuenciación de alto rendimiento de las biopsias de antro gástrico se pueden observar en la tabla 23. Para el

análisis se excluyó la biopsia número 13 debido a que su número de secuencias era diez veces inferior a la siguiente muestra con menor número de secuencias.

Muestras	N	Máximo (secuencias)	Media (secuencias)	Mínimo (secuencias)
Biopsias de antro gástrico	20	147159	64729	15880

Tabla 23. Número máximo, medio y mínimo de secuencias en las 20 biopsias de antro gástrico estudiadas.

#### 6.4.2.1. Estudio de la alfa diversidad

Se realizó un estudio de la alfa diversidad (riqueza de especies en una muestra considerada como homogénea) y se representó mediante curvas de rarefacción. En el figura 24 se representan las curvas pertenecientes a cada una de las muestras analizadas en función del número de OTUs observadas, de modo que se puede comprobar que todas ellas tienden a alcanzar una asíntota, lo que permite saber que se han secuenciado todas las especies presentes en las mismas. Al realizar la representación en función de la distancia filogenética, se obtienen resultados muy similares (figura no mostrada).

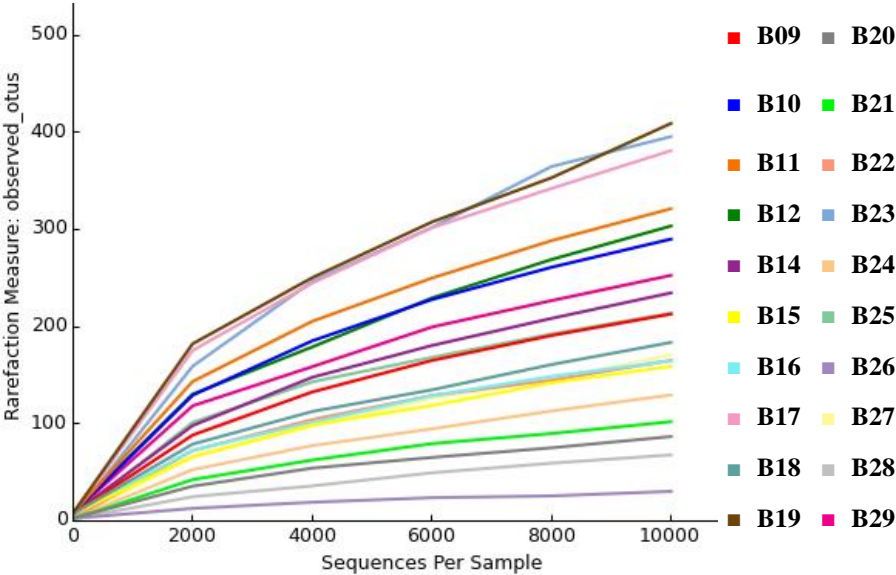


Figura 24. Curvas de rarefacción para cada muestra estudiada. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias.

También se analizó la alfa diversidad en función del estado *H. pylori* positivo frente a negativo de las biopsias (figura 25).

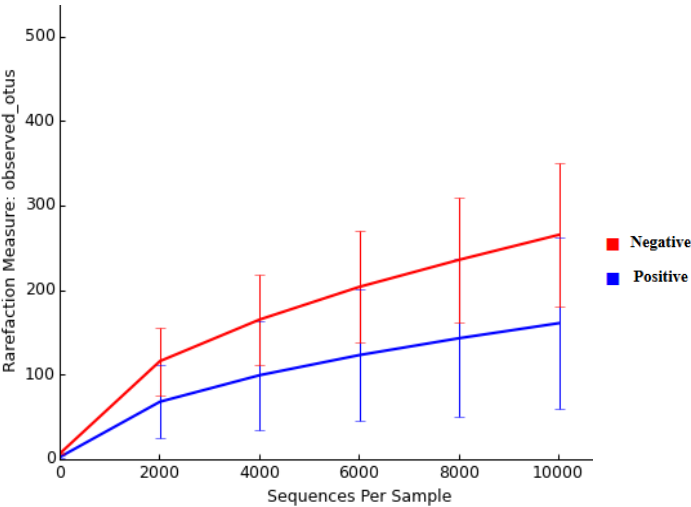


Figura 25. Curvas de rarefacción. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de *H. pylori*.

Se observa que el número de OTUs para un mismo número de secuencias es mayor en el grupo de muestras negativas que en el grupo de las positivas. Al realizar el análisis estadístico mediante análisis de permutaciones de Montecarlo, se obtuvo un p-valor de 0,03.

Al realizar el análisis entre grupos representando distancia filogenética frente a número de secuencias por muestra, se observa igualmente que la distancia filogenética es mayor en el grupo de muestras negativas que en el grupo de muestras positivas para un mismo número de secuencias (figura 26), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p$ -valor=0.16 mediante análisis de permutaciones de Montecarlo).

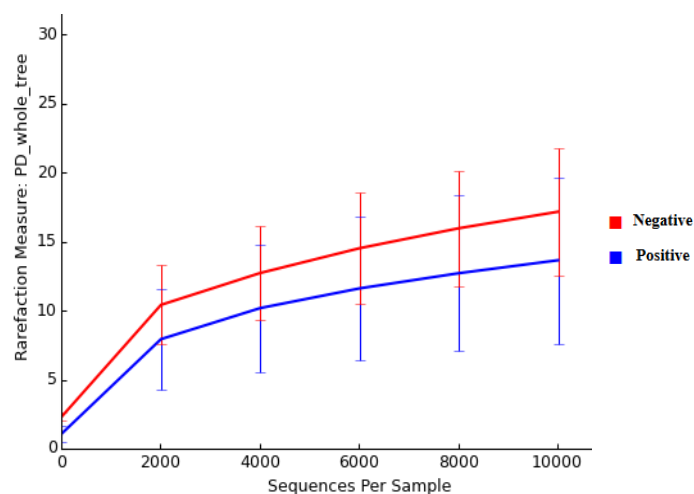


Figura 26. Curvas de rarefacción. Distancia filogenética (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de *H. pylori*.

Se calculó el índice de Shannon para cada muestra, obteniéndose un valor mínimo de 0,40 y un valor máximo de 5,54. La media del índice de Shannon para las biopsias *H. pylori* negativas fue de 4,45 ( $\pm 0,72$ ) y de 1,54 ( $\pm 1,49$ ) para las biopsias *H. pylori* positivas (tabla 24). Las medias del índice de Shannon de ambos grupos se compararon con un test T de Student ( $p < 0,001$ ), por lo que se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

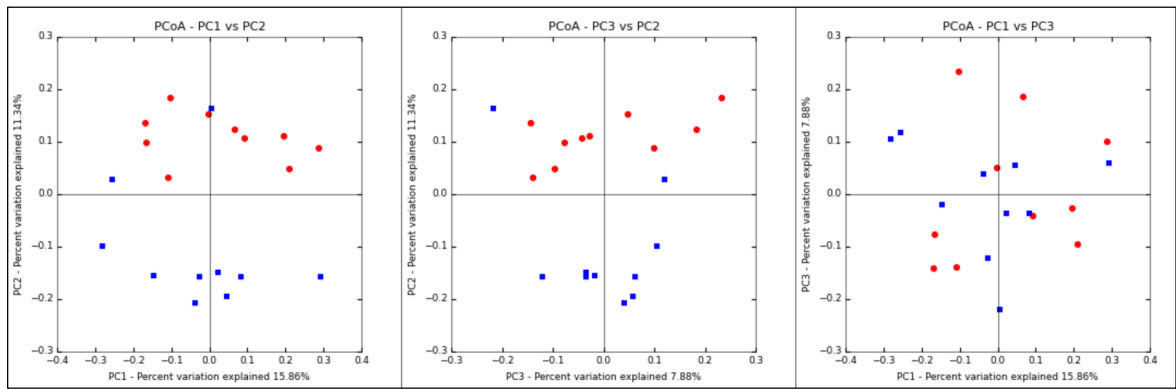
Biopsias <i>H. pylori</i> negativas	B09	B10	B11	B12	B14	B15	B16	B17	B18	B19
Índice Shannon	4,73	4,77	4,83	5,17	4,26	3,70	3,07	4,43	3,97	5,54
Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	4,45 ( $\pm 0,72$ )									
Biopsias <i>H. pylori</i> positivas	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29
Índice Shannon	0,57	0,61	1,28	2,76	0,86	2,42	0,42	0,94	0,40	5,09
Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	1,54 ( $\pm 1,49$ )									

Tabla 24. Índice de Shannon para cada muestra analizada y media del índice de Shannon ( $\pm$  desviación estándar,  $\sigma$ ) en función del estado de *H. pylori*.

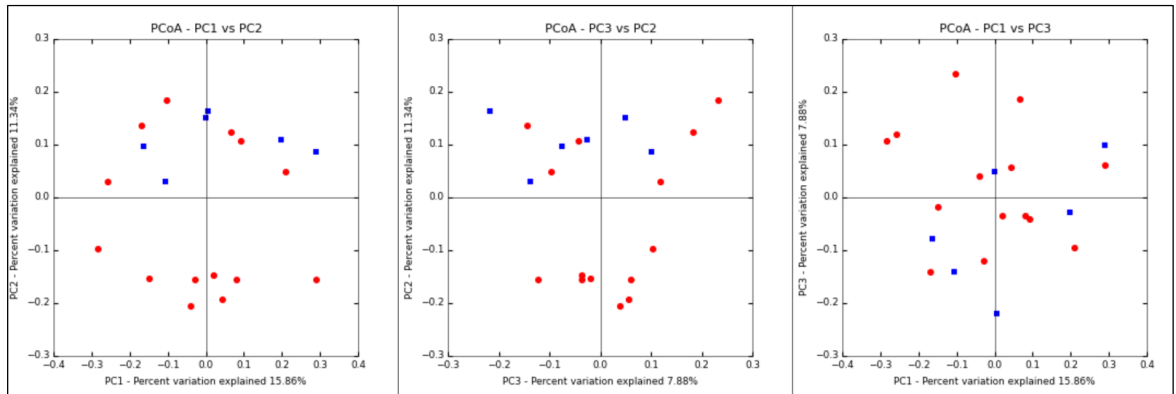
6.4.2.2. Estudio de la beta diversidad

a) Análisis cualitativo (*unweihgtened*)

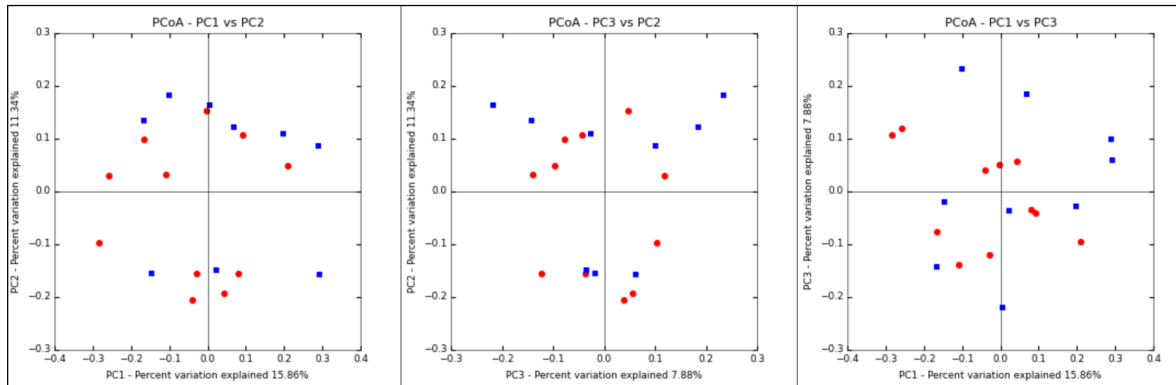
Se realizó un análisis cualitativo de la beta-diversidad en función de diferentes variables. Los resultados del análisis PCoA se muestran a continuación (figura 27). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la beta diversidad en función del cultivo positivo o negativo de *H. pylori* ( $p=0,01$ ). A nivel de histología (hallazgos compatibles con gastritis frente a hallazgos de normalidad) se observa una tendencia cercana a la significación estadística ( $p=0,05$ ). Al analizar los datos respecto al sexo y el hecho de estar los pacientes en situación de infrapeso o peso normal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,81$  y  $0,22$ , respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar las variables nacionalidad y edad (datos no mostrados).



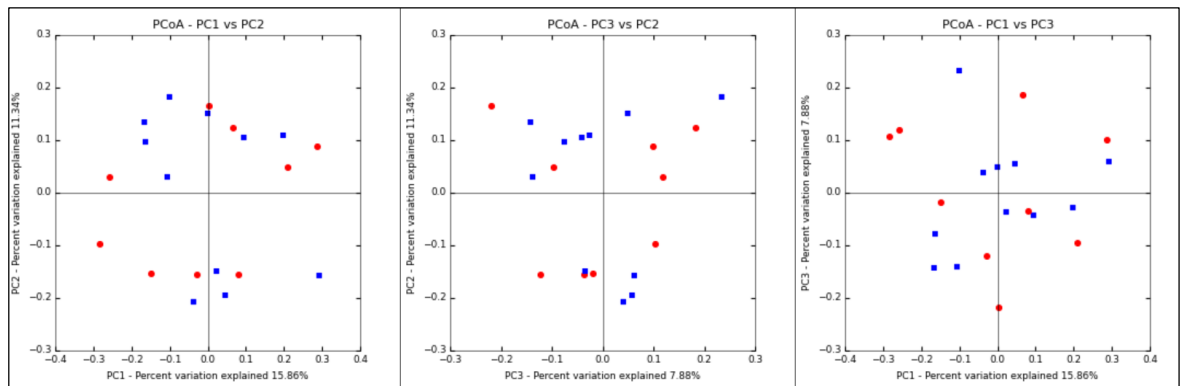
a) ■ Positivo ● Negativo



b) ■ Normal ● Gastritis



c) ■ Infrapeso ● No infrapeso



d) ■ Masculino ● Femenino

Figura 27. Análisis cualitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de *H. pylori* (negativo/positivo)  $p=0,01$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis)  $p=0,05$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso)  $p=0,22$  y d) sexo (masculino/femenino)  $p=0,81$ .

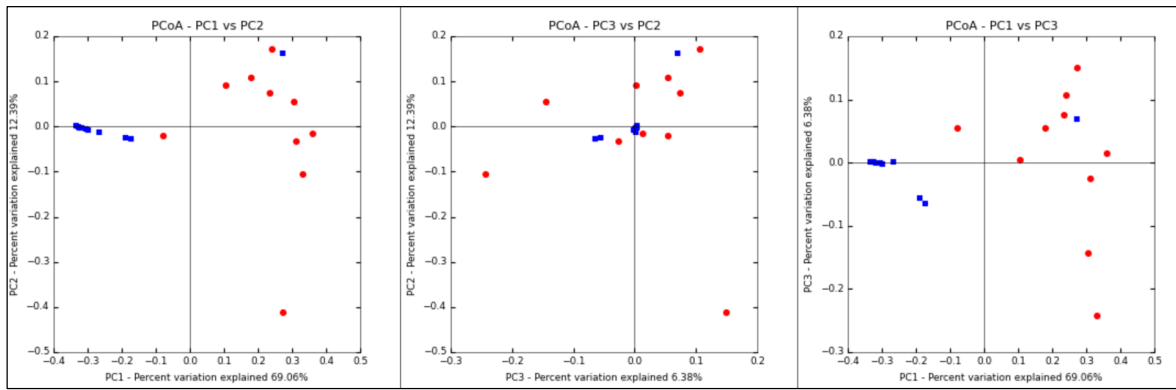
**b) Análisis cuantitativo (*weightened*)**

Se realizó un análisis cuantitativo de la beta-diversidad en función de diferentes variables. Los resultados del análisis PCoA se muestran a continuación (figura 28). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la beta diversidad en función del cultivo positivo o negativo de *H. pylori* ( $p=0,001$ ) y a nivel de histología (hallazgos compatibles con gastritis frente a hallazgos de normalidad) ( $p=0,008$ ). Al analizar los datos respecto al sexo y el hecho de estar los pacientes en situación de infrapeso o peso normal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,62$  y  $0,23$ , respectivamente).

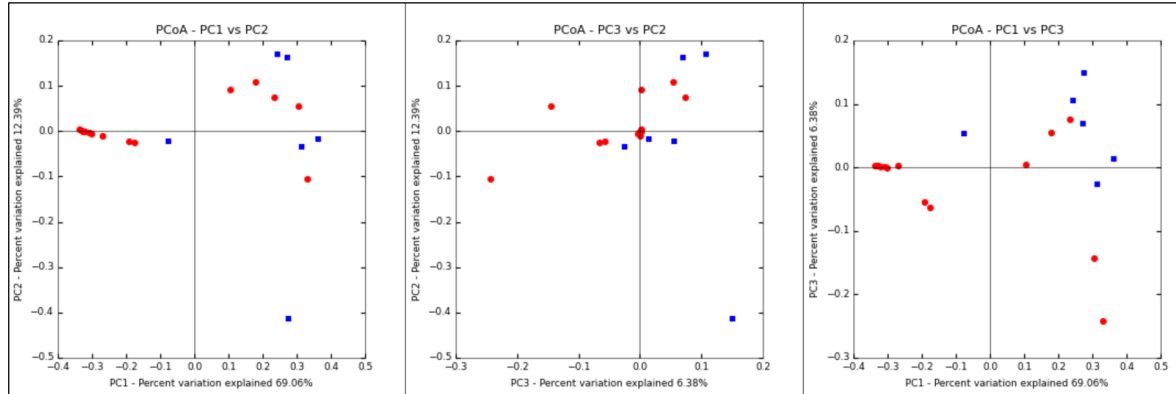
**6.3.1.2. Análisis taxonómico**

En la figura 29 se representa el porcentaje medio de secuencias para los filos más relevantes según el estado de *H. pylori*. Del mismo modo, en la figura 30 se representa el porcentaje medio de secuencias para los géneros más relevantes según el estado de *H. pylori*. Como se puede observar, la diversidad taxonómica del grupo *H. pylori* positivo es inferior a la del grupo *H. pylori* negativo en ambos casos; sin embargo, destaca la presencia de una media del 14% de secuencias del género *Helicobacter* en el grupo de muestras *H. pylori* negativas.

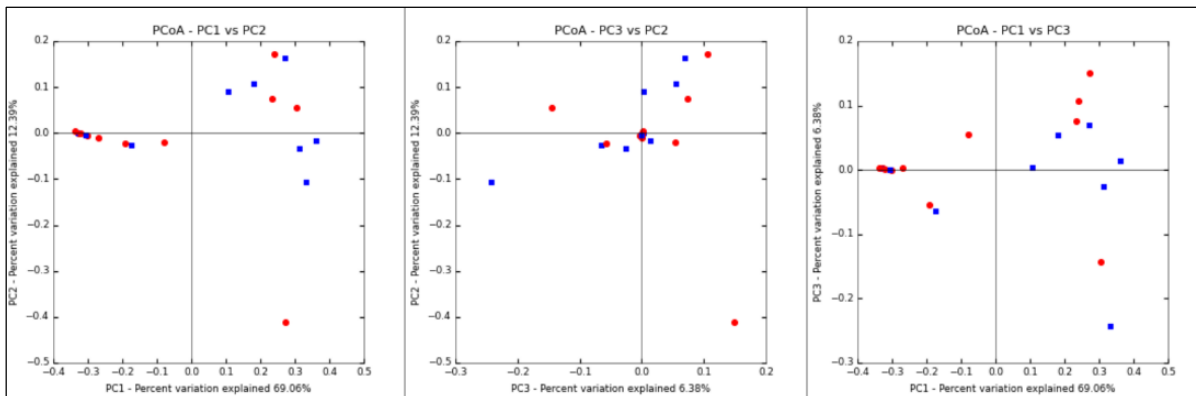




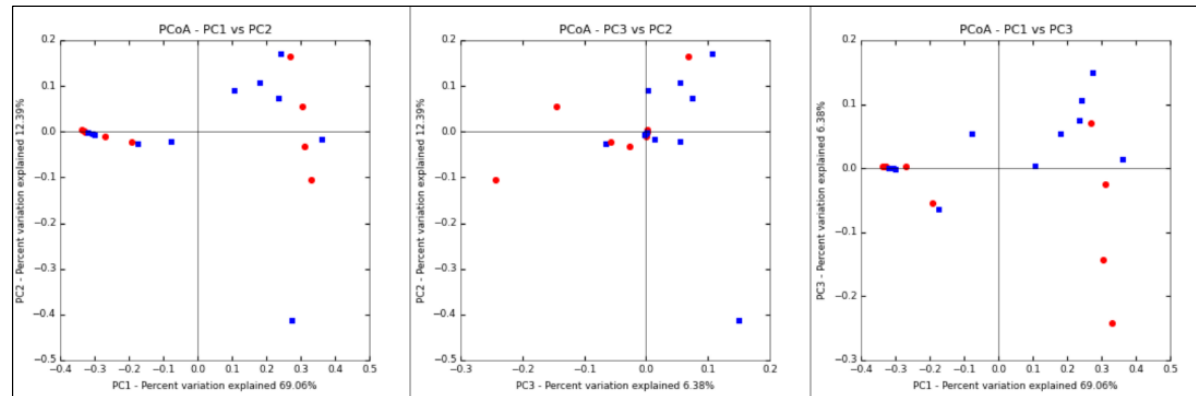
a) ■ Positivo ● Negativo



b) ■ Normal ● Gastritis



c) ■ Infrapeso ● No infrapeso



d) ■ Masculino ● Femenino

Figura 28. Análisis cuantitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de *H. pylori* (negativo/positivo)  $p=0,001$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis)  $p=0,008$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso)  $p=0,23$  y d) sexo (masculino/femenino)  $p=0,62$ .

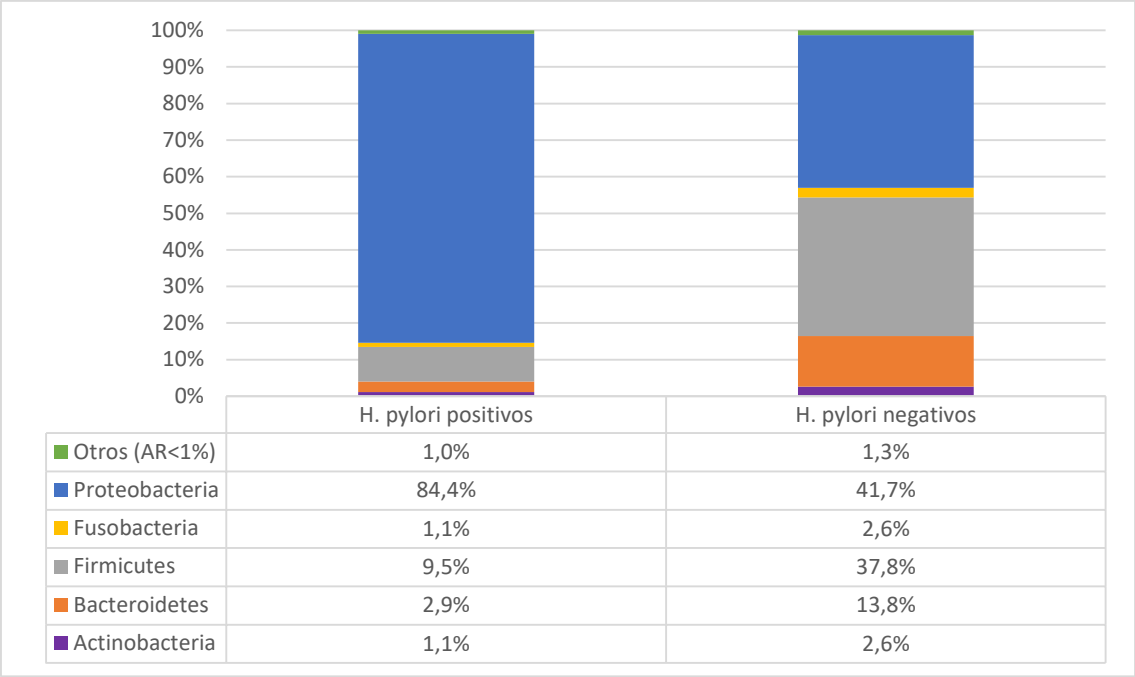


Figura 29. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de filo en función del estado de H. pylori.

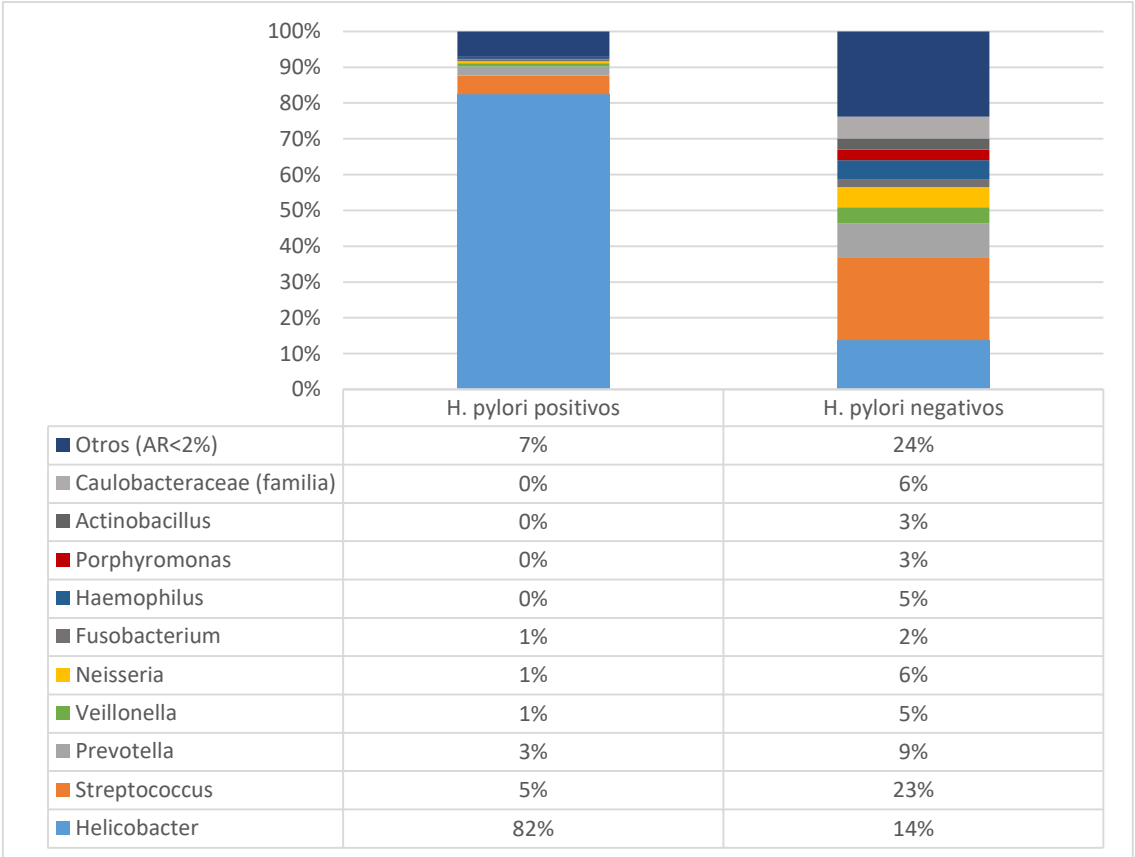


Figura 30. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de género en función del estado de H. pylori.

En la tabla 25 se desglosa el porcentaje de secuencias de *Helicobacter* que se detectaron en cada muestra. Cabe destacar la detección de un porcentaje llamativo de secuencias en algunas de las muestras clasificadas como *H. pylori* negativas (nº 9, 10, 15, 16 y 18) podrían ser pacientes con infección incipiente no diagnosticada. Igualmente, destaca una muestra (nº 29) clasificada como *H. pylori* positiva con un porcentaje de secuencias de *Helicobacter* muy bajo, que podría tratarse de un falso positivo del cultivo.

Muestras <i>H. pylori</i> negativas		Muestras <i>H. pylori</i> positivas	
Nº de muestra	% secuencias <i>Helicobacter</i>	Nº de muestra	% secuencias <i>Helicobacter</i>
9	13,37%	20	97,70%
10	13,04%	21	97,43%
11	1,65%	22	89,55%
12	3,60%	23	72,44%
14	0,05%	24	94,73%
15	27,89%	25	75,21%
16	57,13%	26	99,82%
17	2,29%	27	94,37%
18	12,89%	28	99,05%
19	5,49%	29	4,36%

Tabla 25. Porcentaje de secuencias del género *Helicobacter* para cada muestra analizada.

#### 6.4.3. Microbioma gástrico: análisis mediante 454

El número de secuencias obtenidas por medio de la secuenciación de alto rendimiento de las biopsias de antro gástrico se pueden observar en la tabla 26.

Muestra	N	Máximo (secuencias)	Media (secuencias)	Mínimo (secuencias)
Biopsias de antro gástrico	21	11303	4687	1374

Tabla 26. Número máximo, medio y mínimo de secuencias en las 20 biopsias de antro gástrico estudiadas.

6.4.3.1. Estudio de la alfa diversidad

Se realizó un estudio de la alfa diversidad (riqueza de especies en una muestra considerada como homogénea) y se representó mediante curvas de rarefacción. En la figura 31 se muestran las curvas pertenecientes a cada una de las muestras analizadas en función del número de OTUs observadas, de modo que se puede comprobar que todas ellas alcanzan una asíntota, lo que permite saber que se han secuenciado todas las especies presentes en las mismas. Al realizar la representación en función de la distancia filogenética, se obtienen resultados muy similares (figura no mostrada).

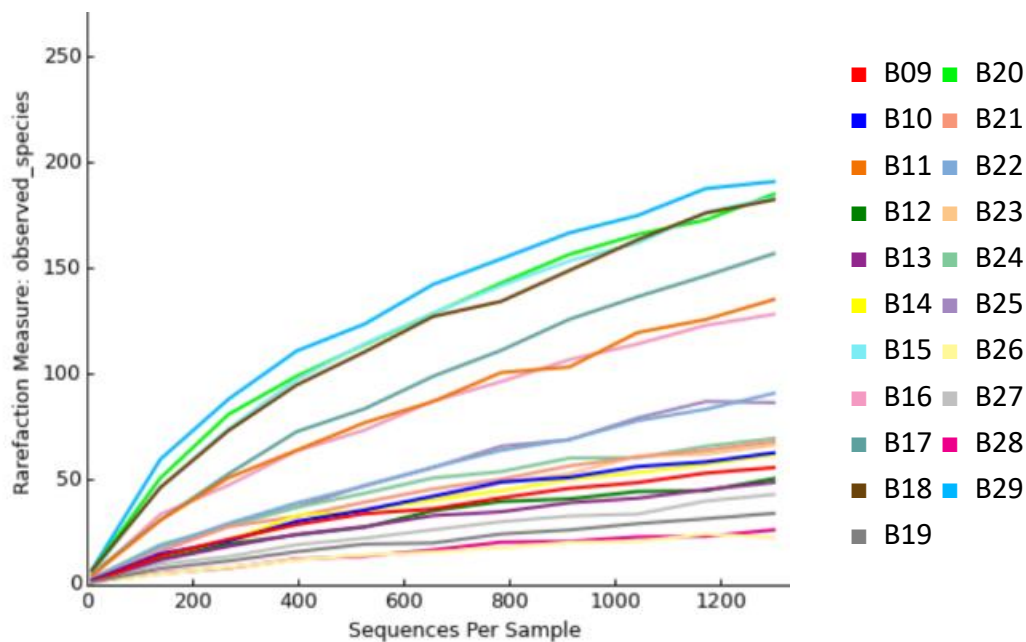


Figura 31. Curvas de rarefacción para cada muestra estudiada. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias.

También se analizó la alfa diversidad en función del estado *H. pylori* positivo frente a negativo. Se observa que el número de OTUs para un mismo número de secuencias es mayor en el conjunto de muestras clasificadas como *H. pylori* negativas que para las positivas (figura 32), aunque las diferencias no fueron significativas ( $p=0,37$  mediante análisis de permutaciones de Montecarlo).

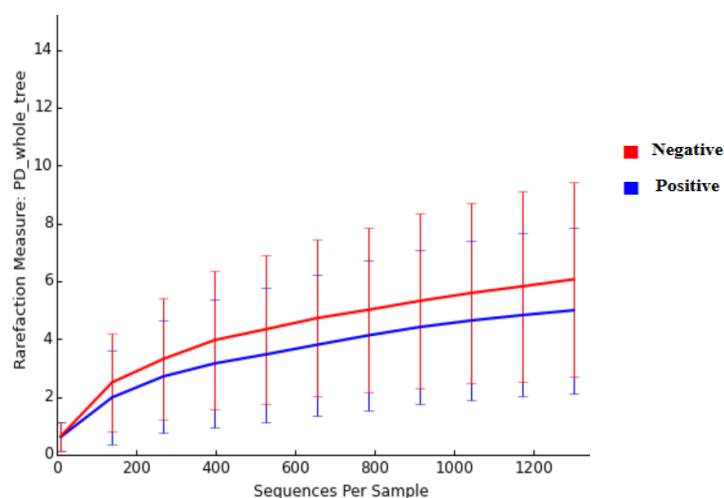


Figura 32. Curvas de rarefacción. Número de OTUs observadas (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de *H. pylori*.

Al realizar el análisis entre grupos representando distancia filogenética frente a número de secuencias por muestra, se observa igualmente que la distancia filogenética es mayor en el grupo de muestras negativas que en el grupo de muestras positivas para un mismo número de secuencias (figura 33). Al realizar el análisis estadístico mediante análisis de permutaciones de Montecarlo, se obtuvo un p-valor de 0,39.

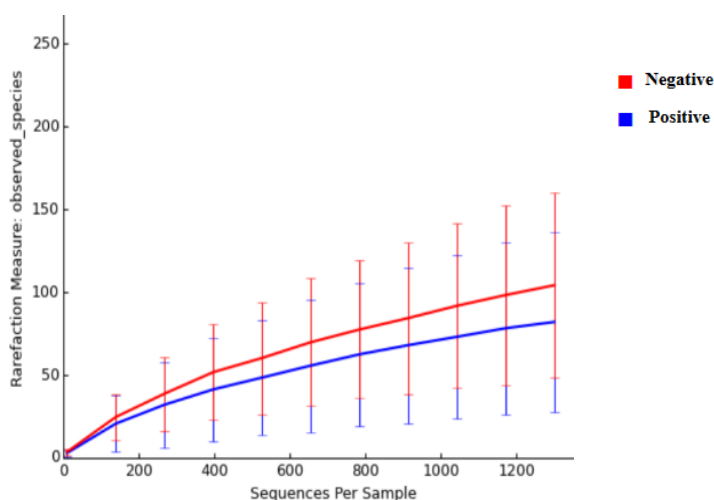


Figura 33. Curvas de rarefacción. Distancia filogenética (Y) en función del número de secuencias (X) según el estado de *H. pylori*.

Se calculó el índice de Shannon para cada muestra, obteniéndose un valor mínimo de 0,35 y un valor máximo de 5,70. La media del índice de Shannon para las

biopsias *H. pylori* negativas fue de 2,27 ( $\pm 1,57$ ) y de 2,03 ( $\pm 1,92$ ) para las biopsias *H. pylori* positivas (tabla 27). Las medias del índice de Shannon de ambos grupos se compararon con un test T de Student ( $p= 0,75$ ), por lo que se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Biopsias <i>H. pylori</i> negativas	B09	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19
Índice Shannon	1,14	1,24	2,84	0,96	0,96	1,09	4,53	3,08	3,69	4,83	0,56
Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	2,27 ( $\pm 1,57$ )										
Biopsias <i>H. pylori</i> positivas	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	
Índice Shannon	5,32	1,58	1,84	1,13	1,84	1,52	0,35	0,62	0,36	5,70	
Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	2,03 ( $\pm 1,92$ )										

Tabla 27. Índice de Shannon para cada muestra analizada y media del índice de Shannon ( $\pm$  desviación estándar,  $\sigma$ ) en función del estado de *H. pylori*.

6.4.3.2. Estudio de la beta diversidad

a) Análisis cualitativo (*unweighted*)

Se realizó un análisis cualitativo de la beta-diversidad en función de diferentes variables. Los resultados del análisis PCoA se muestran a continuación (figura 34). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la beta diversidad en función del cultivo positivo o negativo de *H. pylori* ( $p=0,005$ ). Al analizar los datos respecto a los resultados histológicos (hallazgos compatibles con gastritis frente a hallazgos de normalidad), el sexo y el hecho de estar los pacientes en situación de infrapeso o peso normal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,49$ ,  $p=0,66$  y  $p= 0,90$ , respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias al analizar las variables nacionalidad y edad (datos no mostrados).

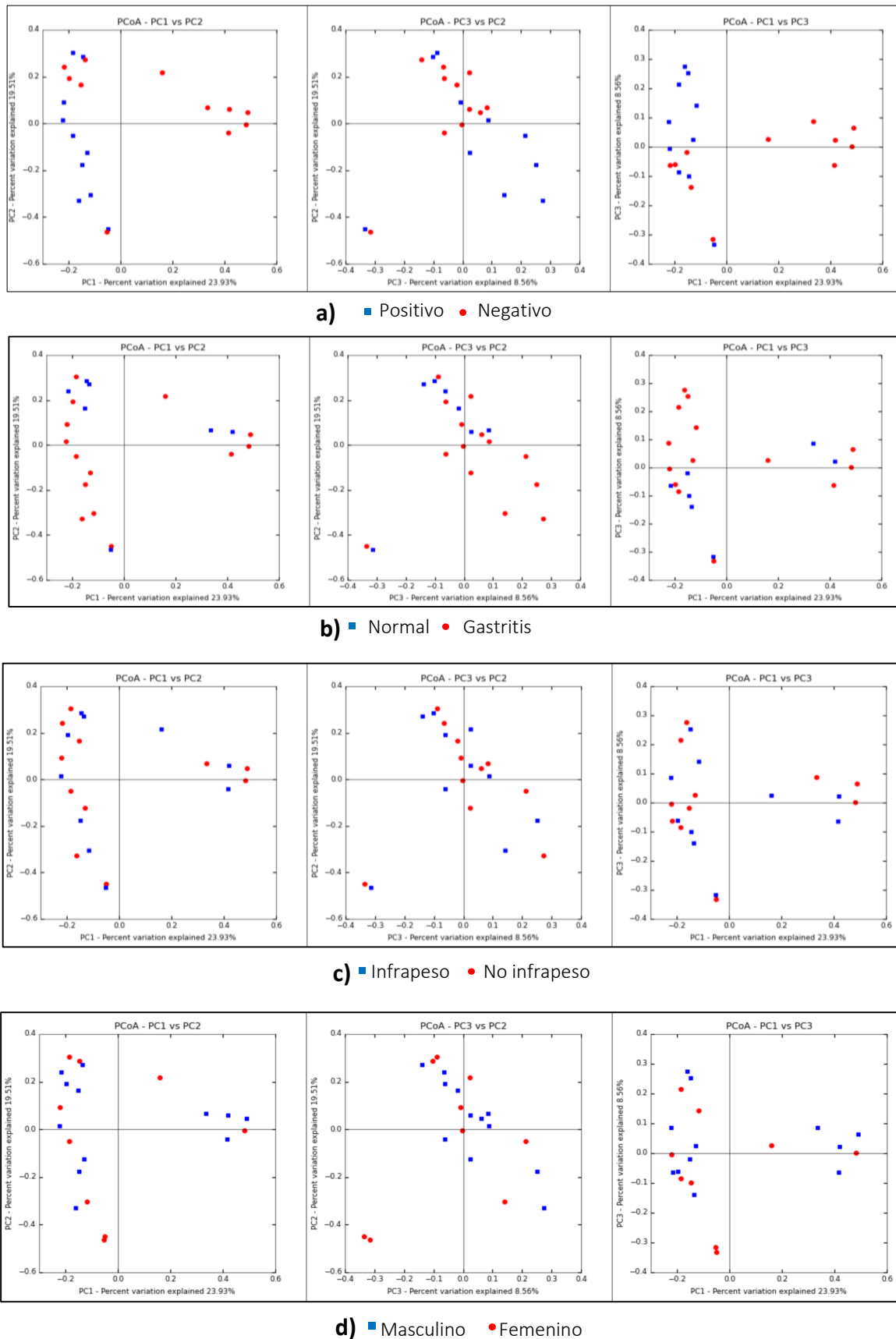


Figura 34. Análisis cualitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de *H. pylori* (negativo/positivo)  $p=0,005$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis)  $p=0,49$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso)  $p=0,90$  y d) sexo (masculino/femenino)  $p=0,66$ .

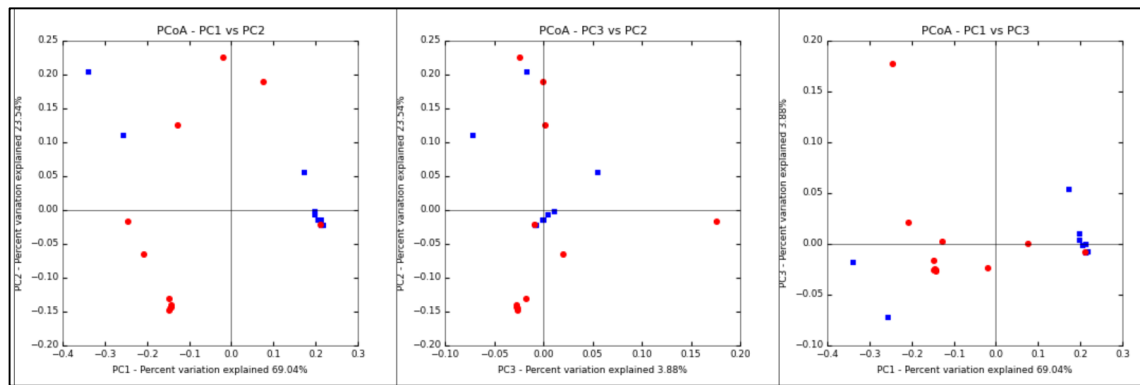
**b) Análisis cuantitativo (*weighted*)**

Se realizó un análisis cuantitativo de la beta-diversidad en función de diferentes variables. Los resultados del análisis PCoA se muestran a continuación (figura 35). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la beta diversidad en función del cultivo positivo o negativo de *H. pylori* ( $p=0,01$ ). Al analizar los datos respecto a los resultados histológicos (hallazgos compatibles con gastritis frente a hallazgos de normalidad), al sexo y el hecho de estar los pacientes en situación de infrapeso o peso normal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,16$ ,  $p=0,73$  y  $0,92$ , respectivamente).

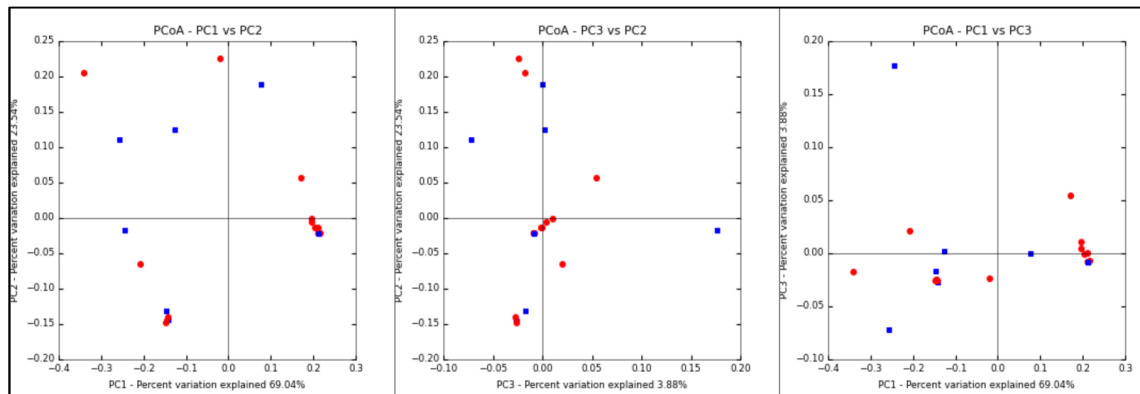
**6.4.3.3. Análisis taxonómico**

En la figura 36 se representa el porcentaje medio de secuencias para los filos más relevantes según el estado de *H. pylori*. Del mismo modo, en la figura 37 se representa el porcentaje medio de secuencias para los géneros más relevantes según el estado de *H. pylori*. Como se puede observar, la diversidad taxonómica del grupo *H. pylori* positivo es inferior a la del grupo *H. pylori* negativo en ambos casos; sin embargo, destaca la presencia de una media del 22% de secuencias del género *Helicobacter* en el grupo de muestras *H. pylori* negativas.

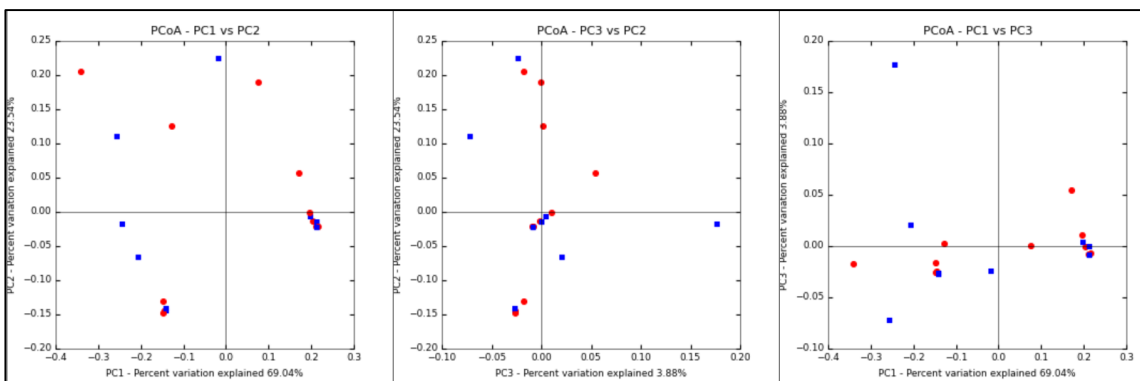




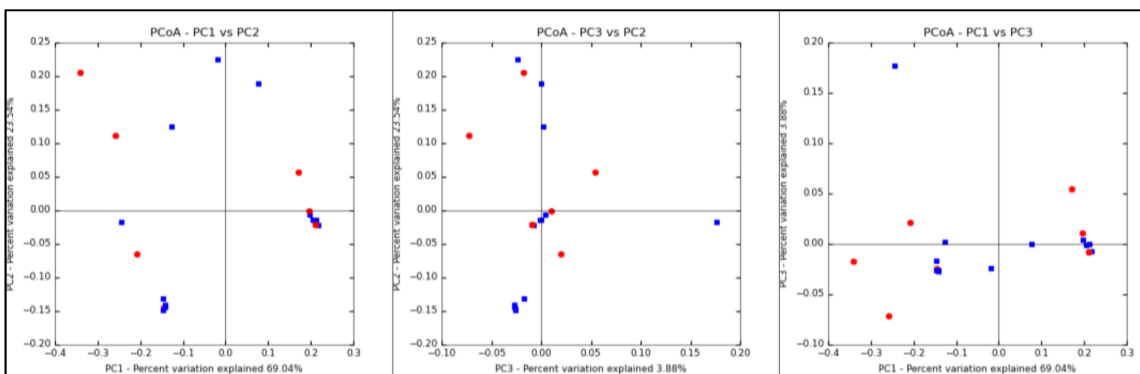
a) ■ Positivo ● Negativo



b) ■ Normal ● Gastritis



c) ■ Infrapeso ● No infrapeso



d) ■ Masculino ● Femenino

Figura 35. Análisis cuantitativo de beta-diversidad en función de a) cultivo de *H. pylori* (negativo/positivo)  $p=0,01$ , b) resultados histológicos (normal/gastritis)  $p=0,16$ , c) índice de masa corporal (infrapeso/no infrapeso)  $p=0,92$  y d) sexo (masculino/femenino)  $p=0,73$ .

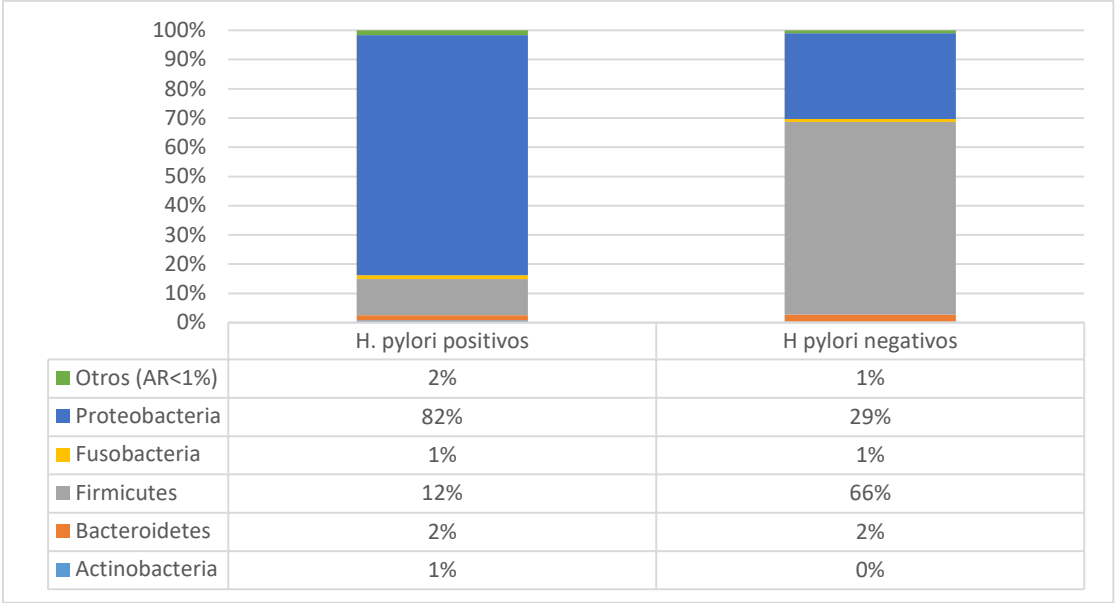


Figura 36. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de filo en función del estado de H. pylori.

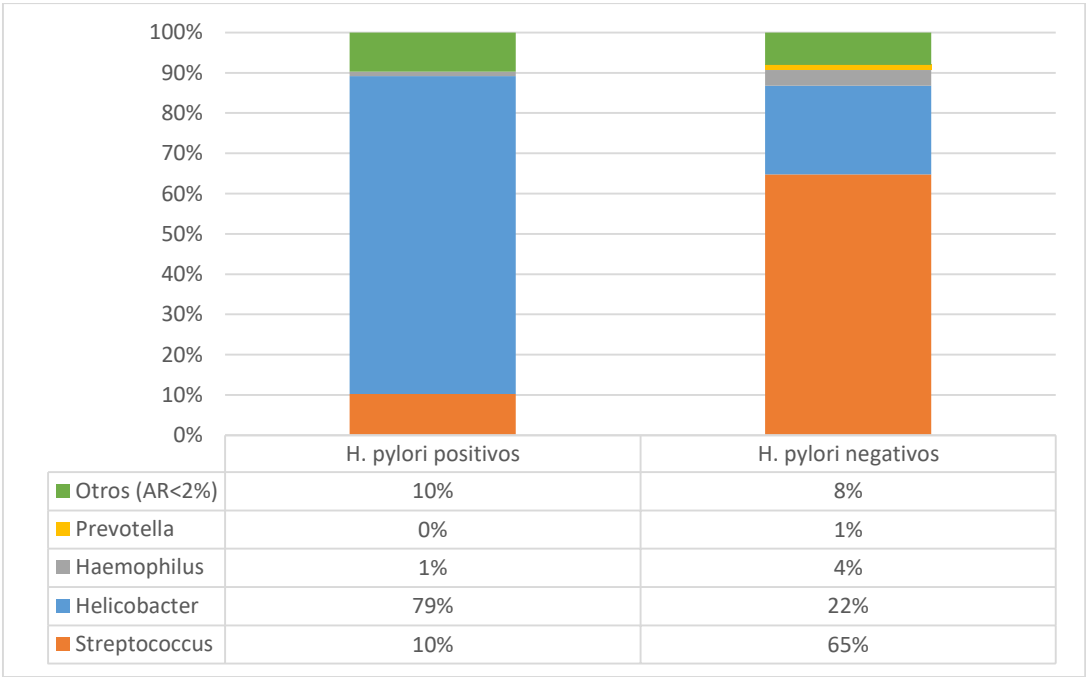


Figura 37. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de género en función del estado de H. pylori.

En la tabla 28 se desglosa el porcentaje de secuencias de *Helicobacter* que se detectaron en cada muestra. Cabe destacar la detección de un porcentaje llamativo de

secuencias en algunas de las muestras clasificadas como *H. pylori* negativas (nº 15, 16, 18 y 19) e, igualmente, destaca una muestra (nº 29) clasificada como *H. pylori* positiva con un porcentaje de secuencias de *Helicobacter* muy bajo. La información de tallada de estos pacientes ya se ha descrito en el apartado de resultados relativo a MiSeq.

Muestras <i>H. pylori</i> negativas		Muestras <i>H. pylori</i> positivas	
Nº de muestra	% secuencias <i>Helicobacter</i>	Nº de muestra	% secuencias <i>Helicobacter</i>
B09	0,6%	B20	5,3%
B10	0,0%	B21	99,8%
B11	1,1%	B22	95,3%
B12	0,2%	B23	96,4%
B13	0,0%	B24	98,6%
B14	0,2%	B25	91,8%
B15	49,4%	B26	99,9%
B16	67,3%	B27	98,6%
B17	0,5%	B28	99,9%
B18	23,2%	B29	4,0%
B19	99,9%		

Tabla 28. Porcentaje de secuencias del género *Helicobacter* para cada muestra analizada.

#### 6.4.4. Microbioma gástrico: análisis comparado

##### 7.4.4.1. Alfa diversidad

Si se comparan los resultados obtenidos para el índice de Shannon en función de la técnica de secuenciación utilizada (tabla 29), se observa que en el grupo de muestras *H. pylori* negativas la media del índice de Shannon varía de forma estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ) según la técnica utilizada. En el caso de las muestras *H. pylori* positivas, la diferencia de la media del índice de Shannon no es estadísticamente significativa ( $p=0,5$ ).

Biopsias <i>H. pylori</i> negativas		B09	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19
MiSeq	Índice Shannon	4,73	4,8	4,8	5,2		4,26	3,7	3,07	4,43	3,97	5,54
	Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	4,45 ( $\pm 0,72$ )										
454	Índice Shannon	1,14	1,2	2,8	0,96	0,96	1,09	4,53	3,08	3,69	4,83	0,56
	Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	2,27 ( $\pm 1,57$ )										
Biopsias <i>H. pylori</i> positivas		B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	
MiSeq	Índice Shannon	0,57	0,6	1,3	2,8	0,9	2,42	0,42	0,94	0,4	5,09	
	Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	1,54 ( $\pm 1,49$ )										
454	Índice Shannon	5,32	1,6	1,8	1,13	1,84	1,52	0,35	0,62	0,36	5,7	
	Media índice Shannon ( $\pm\sigma$ )	2,03 ( $\pm 1,92$ )										

Tabla 29. Índice de Shannon para cada muestra analizada y media del índice de Shannon ( $\pm$  desviación estándar,  $\sigma$ ) en función del estado de *H. pylori* y según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq).

7.4.4.2. Beta diversidad

En la tabla 30 se recogen los p-valores obtenidos tras realizar el análisis ANOSIM sobre los resultados de betadiversidad cualitativa y cuantitativa para las cuatro variables estudiadas (cultivo, histología, infrapeso y sexo). Al analizar la betadiversidad en función del resultado positivo o negativo del cultivo de *H. pylori*, se obtienen resultados estadísticamente significativos por ambas técnicas (MiSeq y 454) y en ambos tipos de análisis (cualitativo y cuantitativo). El análisis de beta-diversidad, tanto cualitativo como cuantitativo, en función de los hallazgos histológicos (normal o gastritis) solo resulta estadísticamente significativo al utilizar tecnología MiSeq, pero no al utilizar 454. El análisis de beta-diversidad en función de las variables infrapeso (sí o no) y el sexo (masculino o femenino) no genera diferencias estadísticamente significativas, independientemente de la técnica de secuenciación utilizada.

Variable	Análisis	p-valor MiSeq	p-valor 454
Cultivo	Cualitativo	0,01	0,005
	Cuantitativo	0,001	0,01
Histología	Cualitativo	0,05	0,49
	Cuantitativo	0,008	0,16
Infrapeso	Cualitativo	0,22	0,90
	Cuantitativo	0,23	0,92
Sexo	Cualitativo	0,81	0,66
	Cuantitativo	0,62	0,73

Tabla 30. p-valor obtenido al realizar análisis cualitativo y cuantitativo de beta-diversidad en función de los resultados del cultivo, hallazgos histológicos, infrapeso y sexo según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq)

#### 7.4.4.3. Análisis taxonómico

Si se comparan los resultados del análisis taxonómico en función de la técnica de secuenciación utilizada y para cada grupo (*H. pylori* positivo o *H. pylori* negativo), se observa que, a nivel de filo (figura 38), los porcentajes de secuencias asignados a cada uno de ellos se mantienen similares en el grupo *H. pylori* positivos y se mantiene el orden de abundancias; sin embargo, en el grupo *H. pylori* negativos, el filo más abundante al secuenciar mediante tecnología MiSeq es Proteobacteria (41,7%), seguido de Firmicutes (37,8%) y al secuenciar mediante tecnología Roche se invierte el orden con un 66% de secuencias de Firmicutes y un 29% de Proteobacteria.

Al realizar esta misma comparación a nivel de género (figura 39), en el grupo de *H. pylori* positivos se observa un porcentaje de secuencias de *Helicobacter* similar (en torno al 80% de abundancia relativa) para la secuenciación mediante tecnología MiSeq y 454. En el resto de géneros los porcentajes varían ligeramente, pero los resultados son asimilables. Por el contrario, en el grupo *H. pylori* negativo, se observan diferencias

llamativas en función del tipo de tecnología de secuenciación, apareciendo en la secuenciación por MiSeq muchos más géneros con abundancias relativas entre el 2% y el 9% que prácticamente no tienen secuencias asignadas cuando se utiliza la tecnología 454. En ambos casos, es llamativo el porcentaje de abundancia relativa de *H. pylori* (14% para tecnología MiSeq y 22% para 454), teniendo en cuenta que se trata del grupo *H. pylori* negativo.

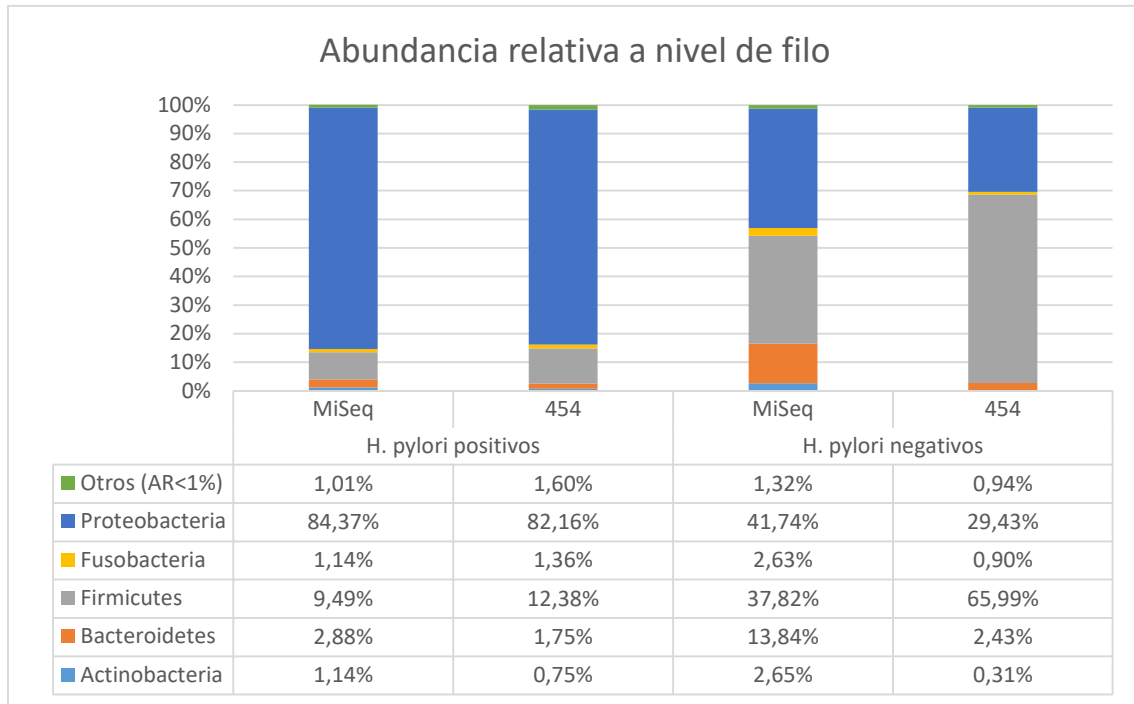


Figura 38. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de filo en función del estado de *H. pylori* y según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq).

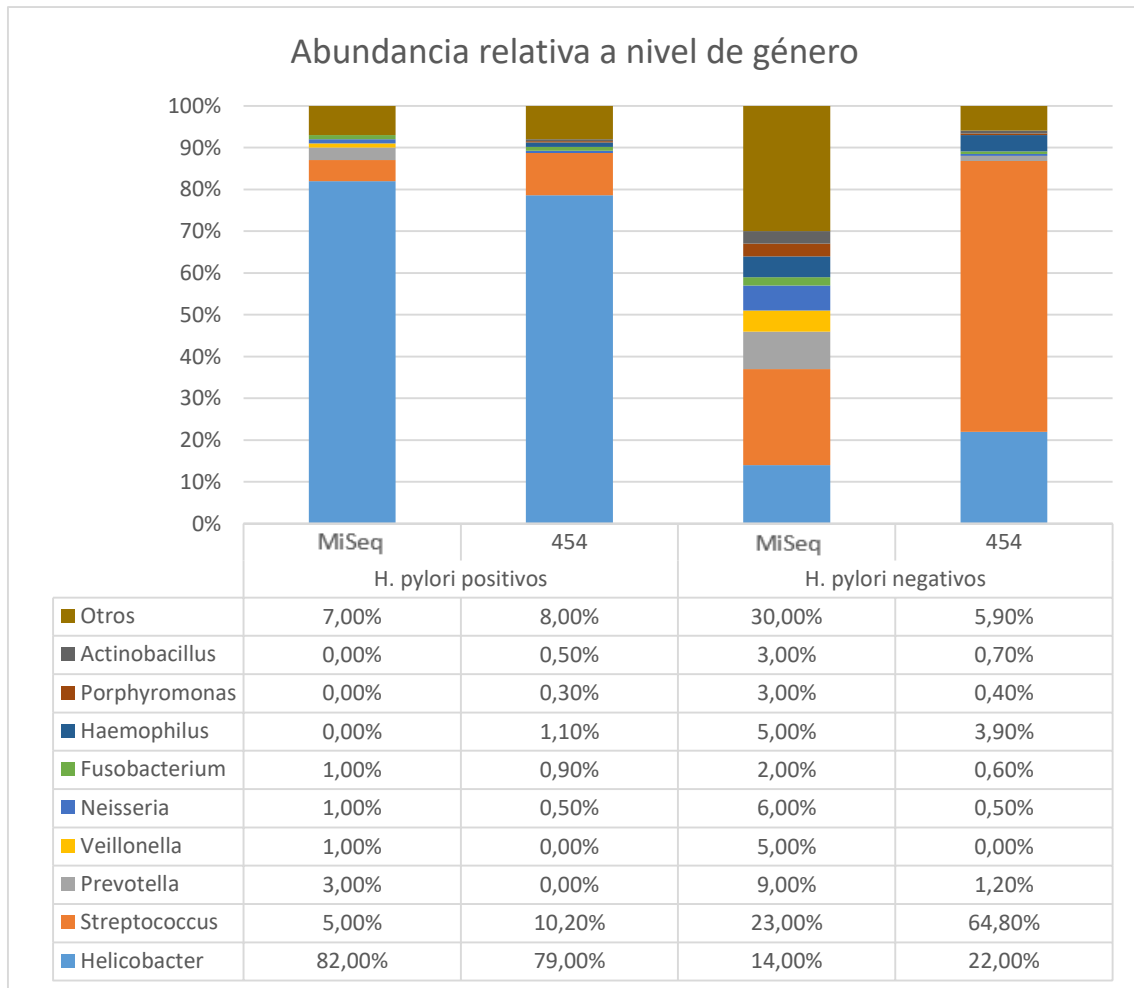


Figura 39. Porcentajes medios de abundancias relativas a nivel de género en función del estado de *H. pylori* y según el tipo de técnica utilizada (454 frente a MiSeq).

Si se compara el porcentaje de abundancia relativa del género *Helicobacter* en cada una de las muestras estudiadas y según el tipo de tecnología de secuenciación utilizada, se observa que algunas muestras del grupo *H. pylori* negativo (como por ejemplo las B15, B16 y B18) tienen secuencias de *Helicobacter* con una abundancia relativa superior al 10% en ambos abordajes de secuenciación. Otras muestras, como las B09, B10 y B19 presentan abundancias relativas de *Helicobacter* superiores al 10% solo mediante una de las dos tecnologías de secuenciación. Sin embargo, en el grupo de *H. pylori* positivos, los resultados son mucho más homogéneos, siendo únicamente discordante de forma clara la muestra B20, que presenta un 5,3% de abundancia relativa mediante tecnología 454 y un 97,7% mediante MiSeq. Por otra parte, la muestra B29, a pesar de estar clasificada como *H. pylori* positiva, presenta una abundancia de *Helicobacter* inferior al 5% por ambos métodos de secuenciación.

Muestras <i>H. pylori</i> negativas			Muestras <i>H. pylori</i> positivas		
Nº de muestra	% secuencias <i>Helicobacter</i>	% secuencias <i>Helicobacter</i>	Nº de muestra	% secuencias <i>Helicobacter</i>	% secuencias <i>Helicobacter</i>
	(MiSeq)	(454)		(MiSeq)	(454)
B09	13,37%	0,60%	B20	97,70%	5,30%
B10	13,04%	0,00%	B21	97,43%	99,80%
B11	1,65%	1,10%	B22	89,55%	95,30%
B12	3,60%	0,20%	B23	72,44%	96,40%
B13		0,00%	B24	94,73%	98,60%
B14	0,05%	0,20%	B25	75,21%	91,80%
B15	27,89%	49,40%	B26	99,82%	99,90%
B16	57,13%	67,30%	B27	94,37%	98,60%
B17	2,29%	0,50%	B28	99,05%	99,90%
B18	12,89%	23,20%	B29	4,36%	4,00%
B19	5,49%	99,90%			

Tabla 31. Porcentaje de secuencias del género *Helicobacter* para cada muestra analizada según el tipo de técnica utilizada (MiSeq frente a 454).



#### 6.4.5. Microbioma gástrico: microorganismos transcripcionalmente activos

Se estudiaron 7 biopsias de antro gástrico clasificadas como *H. pylori* positivas y 7 clasificadas como *H. pylori* negativas.

En la tabla 32 se recogen los porcentajes medios de secuencias detectadas para los principales géneros presentes en las biopsias de antro gástrico en función del estado de *H. pylori* y de que el ácido nucleico de partida en el estudio fuese ARN o ADN.

Género	<i>H. pylori</i> positivos DNA	<i>H. pylori</i> negativos DNA	<i>H. pylori</i> positivos RNA	<i>H. pylori</i> negativos RNA
<i>Streptococcus</i>	2,3%	24,1%	11,9%	15,8%
<i>Helicobacter</i>	89,6%	5,7%	32,3%	10,1%
<i>Haemophilus</i>	0,3%	7,2%	0,03%	0,2%
<i>Neisseria</i>	0,6%	6,8%	0,7%	1,8%
<i>Veillonella</i>	0,7%	5,5%	1,8%	2,1%
<i>Prevotella</i>	1,1%	6,0%	0,6%	0,3%
Otros	5,4%	44,7%	52,6%	69,7%

Tabla 32. Porcentajes medios de secuencias detectadas para los principales géneros presentes en las biopsias de antro gástrico en función del estado de *H. pylori* y el ácido nucleico de partida (ARN o ADN).

Como ya se ha comentado anteriormente, destaca el predominio de secuencias de *Helicobacter* detectadas a partir de ADN en las muestras *H. pylori* positivas, frente al predominio de secuencias de *Streptococcus* en el grupo de muestras *H. pylori* negativas. En cuanto a las secuencias detectadas a partir de ARN, el género predominante es *Helicobacter* en las muestras *H. pylori* positivas, aunque también se detectan secuencias de *Helicobacter* a partir de ARN en las muestras *H. pylori* negativas, si bien en este grupo es *Streptococcus* el que aporta mayor porcentaje de secuencias.

En la tabla 33 se puede observar el ratio de actividad (RA) medio para cada uno de los 6 géneros más predominantes en función del estado de *H. pylori*.

Género	<i>Streptococcus</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Prevotella</i>
<i>H. pylori</i> positivos	29,86	0,37	1,80	0,93	6,26	2,36
<i>H. pylori</i> negativos	0,72	3,11	0,01	0,28	0,57	0,06

Tabla 33. Ratio de actividad (RA) de los diferentes géneros bacterianos según el estado de *H. pylori*.

Los géneros *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella* y *Prevotella*, se encuentran más activos en las muestras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos, mientras que el género *Helicobacter* resulta tener mayor RA en las muestras de pacientes *H. pylori* negativos.

## DISCUSIÓN

---

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Patrón de sensibilidad antibiótica

Las cepas estudiadas mostraron un porcentaje elevado (90% o superior) de sensibilidad a amoxicilina, levofloxacino y tetraciclinas; sin embargo, los porcentajes de sensibilidad a claritromicina, rifampicina y metronidazol fueron mucho más bajos (70% o inferior).

A la hora de evaluar la resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori*, hay que tener en cuenta que hasta 2011 no se disponía de puntos de corte elaborados por un comité europeo para la interpretación del antibiograma de *H. pylori*. Hasta esa fecha, los únicos puntos de corte disponibles era los publicados por el *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) de Estados Unidos y la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC), que fijaban una CMI más elevada que la que actualmente fija el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) para distinguir entre cepas sensibles y resistentes. En el caso de amoxicilina, tratamiento de primera línea, EUCAST considera resistentes aquellas cepas con CMI  $>0,12$  mg/L, mientras que BSAC fijaba el punto de corte en una CMI  $\geq 2$  mg/L. Esto puede explicar por qué en diversos estudios anteriores a 2011 no se encontraron resistencias a amoxicilina en España (155) y en un estudio multicéntrico europeo que fijaba un punto de corte de CMI  $>0,5$  mg/L se describían como esporádicas (156). En estudios posteriores a 2011, en España se describieron resistencias a amoxicilina del 8,5% en Madrid (133), pero no se encontraron en otras regiones (157), lo que sugiere variabilidad geográfica. Los resultados del presente estudio, con una resistencia a amoxicilina del 10% y cepas

obtenidas en la Comunidad de Madrid, concuerdan con lo descrito previamente, aunque puede estar sobredimensionado por el limitado número de cepas incluidas.

Las cepas de *H. pylori* con resistencia a claritromicina, incluida también entre las terapias de primera línea, son cada vez más prevalentes. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera de alta prioridad la búsqueda de alternativas de tratamiento para *H. pylori* resistente a este antibiótico. El CLSI establece un punto de corte de una CMI  $\geq 1$  mg/L, mientras que el EUCAST lo fija en  $>0,5$  mg/L. En 2006 se publicó un estudio multicéntrico con pacientes pediátricos a nivel europeo (136) en el que se describe una resistencia global a claritromicina del 20%, pero se señala que vivir o ser originario del sur de Europa (España, Portugal, Grecia e Italia) supone un riesgo 2,25 veces superior para ser portador de una cepa resistente. Del mismo modo, tener menos de 6 años también supone un riesgo incrementado, pero esto no pudo comprobarse en nuestro estudio porque el paciente de menor edad tenía 8 años. Estos datos explican que el porcentaje de resistencia a claritromicina en nuestro estudio sea del 60%, en torno a lo que ya se había descrito previamente en cepas de origen español (133). En otras regiones del mundo, como Estados Unidos o Italia, utilizando puntos de corte de CLSI, se describieron prevalencias de resistencia por encima del 70% (158,159).

En España, debido a la elevada prevalencia de resistencias a claritromicina, se recomienda abandonar como primera línea de tratamiento la clásica terapia triple (IBP, amoxicilina y claritromicina) y se sustituye por una pauta cuádruple concomitante que añada metronidazol. El punto de corte establecido por BSAC y EUCAST para metronidazol es una CMI  $>8$  mg/L. De todas las posibles resistencias que puede presentar *H. pylori*, la resistencia a metronidazol es la más prevalente en todo el mundo.

Así lo demuestra un estudio reciente que compara todas las regiones de la OMS, que sitúa la resistencia a este antibiótico en la región europea en torno al 38% (160).

En nuestro caso, y al igual que se había descrito previamente en España en pacientes pediátricos (133), la resistencia a claritromicina supera a la resistencia a metronidazol. Estos resultados también se observaron en estudios europeos (160,161) en pacientes pediátricos, pero no en adultos. Dado que la prevalencia de la infección por *H. pylori* aumenta con la edad de la población, en las revisiones sistemáticas en las que no se analizan los datos de resistencias en adultos y niños de forma separada, es difícil percibir este fenómeno.

En cuanto a resistencias combinadas, un 30% de las cepas de nuestro estudio fueron resistentes a claritromicina y metronidazol (siendo una de ellas además resistente a amoxicilina). En Europa, la prevalencia de cepas resistentes a claritromicina y metronidazol aumentó del 15% en el periodo 2006-2008 hasta el 23% en el periodo 2012-2016 (160), siendo en ese momento la región con mayor prevalencia de resistencia combinada a ambos antibióticos de todas las analizadas.

El levofloxacino constituye un tratamiento de segunda línea, que debe utilizarse solo en caso de fallo terapéutico de una pauta con claritromicina. En general, la resistencias a levofloxacino no son muy elevadas, rondando el 14% en Europa, donde además se mantienen bastante estables con el paso de los años (160). En España, se han descrito resistencias en pacientes pediátricos del 6,7% (133). A nivel europeo, las resistencias en pacientes pediátricos se mantienen por debajo del 5%, pero alcanzan cifras superiores al 10% en adultos (160,161). Además, se ha demostrado que existe una correlación entre el consumo de quinolonas en los diferentes países europeos y la prevalencia de *H. pylori* con resistencia a levofloxacino (161).

Estos datos, en su conjunto, destacan la importancia de realizar un antibiograma siempre que sea posible para dirigir el tratamiento desde un primer momento y evitar fallos terapéuticos (162). Además, se hace patente la necesidad de que todos los países diseñen programas para un uso responsable de antibióticos, que eviten su mala prescripción y consumo y contribuyan a controlar la emergencia y aumento de las resistencias antibióticas. En España, en 2014 se aprobó el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) con el objetivo de frenar el crecimiento de la resistencia a los antimicrobianos.

## 7.2. Análisis de genomas completos

### 7.2.1. Factores de virulencia

El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido que la secuenciación de genomas bacterianos completos sea una tarea relativamente sencilla y cada vez más accesible. El primer genoma completo de *H. pylori* se secuenció en 1997, pero fue a partir de mediados de la primera década de los años 2000, con el inicio de la secuenciación masiva, cuando el número de genomas completos depositados en Genbank aumentó de forma muy llamativa (59). Este hecho conllevó, entre otras cosas, que los estudios que clásicamente se habían realizado en base a reacciones de PCR como, por ejemplo, el estudio de factores de virulencia, puedan realizarse actualmente mediante técnicas de secuenciación de genoma completo (WGS). El hecho de secuenciar un genoma completo implica que, mientras se conserven informáticamente los datos de dicho genoma, siempre se podrá recurrir a él para hacer cualquier tipo de comprobación o en futuros estudios, mientras que los estudios basados en PCR implican volver a realizar trabajo de laboratorio para cualquier tipo de ampliación.

En nuestro caso, la secuenciación de 20 genomas completos de *H. pylori*, permitió el estudio de 14 genes codificantes para proteínas de membrana externa, 4 sistemas de secreción y los genes que codifican los productos proteicos que conforman la ureasa y los flagelos, así como el estudio de tipado mediante MLST *in silico*, la representación mediante un árbol filogenético y el análisis del genoma *core*.

Los factores de virulencia de *H. pylori* han sido tema de estudio desde hace años, si bien las limitaciones que supone realizarlos mediante PCR explican que no se encuentre demasiada literatura científica en la que se analicen más de tres o cuatro genes. En ese sentido, el estudio de los eslovenos Šterbenc *et al.* (163) es uno de los más completos. Los autores analizan mediante PCR la presencia de los genes *cagA*, *iceA*, *homA* y *homB* y caracterizan los genes *vacA* y *babA* en 260 cepas, relacionando los diferentes patrones obtenidos con el grado de daño en la mucosa gástrica. Concluyen que la presencia de *homA* está relacionada con la ausencia de *homB*, al igual que se observa en nuestro estudio, en el que el 100% de las cepas presentaron *homA* y ninguna *homB*. También describen un 77,9% de cepas *vacAs1* y un 43,9% de cepas *vacAm1*. En este sentido, nuestras cepas presentan porcentajes mucho menores de ambos marcadores (25% *vacAs1* y 5% *vacAm1*), lo que puede deberse a las variaciones genéticas que presentan las cepas de *H. pylori* en base a su distribución geográfica, como se refleja en un estudio portugués donde concluyen que los genotipos s1 y m1 de *vacA* son infrecuentes (164) y en un estudio español anterior (165). Šterbenc *et al.* también describen un 59,6% de cepas portadoras del gen *cagA* y un 50,1% de *babA2*. En nuestro caso, solo un 25% (4/20) de las cepas estudiadas presentaron el gen *cagA* y solo en 2 cepas de las 10 portadoras de *babA* se pudo confirmar que se trataba del alelo *babA2*. Cabe destacar que la gran mayoría de estudios relativos a la prevalencia de *cagA*, se



limitan a estudiar la presencia o ausencia del gen *cagA*, cuando en realidad se sabe que una gran parte de las cepas mundiales presentan reordenamientos de la isla *cagPAI* que inutilizan el SST4 (166). En nuestro estudio, si bien no se pudo analizar la integridad de *cagPAI*, sí se comprobó que, de las 4 cepas *cagA* positivas, 3 presentaban los 7 genes descritos como imprescindibles para el funcionamiento del SST4 (85).

En conjunto, Šterbenc *et al.* concluyen que las siguientes combinaciones de factores de virulencia, se correlacionan con un mayor daño en la mucosa gástrica: *vacA* s1m1/*cagA*+/*babA2*+/*homb*+, *vacA* s1m2/*cagA*+/*babA2*+/*homA*+, *vacA* s1m1/*cagA*+/*babA2*+/*homA*+, *vacA* s1m1/*cagA*+/*babA2*-/*homA*+, *vacA* s1m2/*cagA*-/*babA2*-/*homA*+ y *vacA* s2m2/*cagA*-/*babA2*-/*homb*+. De las 20 cepas caracterizadas en nuestro trabajo, cuatro de ellas cumplen alguna de las combinaciones descritas en el estudio: las cepas ES-54 y ES-61 presentan la combinación *vacA* s1m2/*cagA*+/*babA2*+/*homA*+, la cepa ES-SN *vacA* s1m1/*cagA*+/*babA2*-/*homA*+ y la cepa ES-DO *vacA* s1m2/*cagA*-/*babA2*-/*homA*+. Quizás sea esta última el caso más interesante, ya que a pesar de ser una configuración de las clásicamente consideradas como menos virulentas (*vacA* no s1m1, sin *cagA* y sin *babA2*) el paciente del que se aisló esta cepa fue el único de los 20 estudiados que presentó microulceraciones. Además, si bien las cepas *vacA* s2m2, *cagA* negativas se consideran menos virulentas a efectos de daño gástrico, hay que tener en cuenta que son este tipo de cepas las que se han relacionado con prevalencias más elevadas de resistencia a claritromicina (167,168), como ocurre en nuestro caso, donde las cuatro cepas *vacA* s1, *cagA* positivas fueron sensibles a claritromicina y, de las 16 cepas restantes, todas *vacA* s2m2, *cagA* negativas, 11 presentaron resistencia a claritromicina.

Relativo al gen *cagA*, se ha descrito en múltiples ocasiones que no todas las cepas que expresan la proteína CagA tienen asociado el mismo potencial de virulencia. Este varía en función de los motivos EPIYA presentes en la proteína. Así, en las cepas que se estudian en el presente trabajo, se han clasificado dos cepas con motivos EPIYA tipo –BC y otras dos con motivos ABC. Si bien lo más frecuente en países Europeos son las cepas con EPIYA tipo ABC, los motivos –BC se han descrito como infrecuentes en varios estudios y la cepa de referencia HP J99 presenta dicha configuración (169–171). Además, aunque tradicionalmente se haya dado el nombre de EPIYA a este motivo aminoacídico por ser el más frecuente, actualmente se sabe que son muchos más los motivos que incluyen sitios de fosforilación en CagA (150), sobre todo en las secuencias de tipo B, donde es frecuente encontrar la secuencia de aminoácidos EPIYT. Zhang X-S *et al.*, describieron que la prevalencia de los motivos EPITY es elevada (32,9% frente a 55,5% de EPIYA) en las secuencias de tipo B de cepas occidentales y además, que este patrón se relaciona menos con el desarrollo de cáncer gástrico que el EPIYA (172). En nuestro estudio, las dos cepas con configuración –BC y una de las cepas ABC presentaron motivos EPIYT en la secuencia de tipo B. La cepa restante (ES-SN) presentó una configuración ABC clásica con tres motivos EPIYA tradicionales.

Además de *vacA* y *cagPAI*, *H. pylori* presenta una gran cantidad de proteínas de membrana externa (OMPs, del inglés *Outer Membrane Proteins*), entre las cuales se encuentran los productos de los genes *homA*, *homB* y *babA* ya discutidos. Dentro de este grupo de OMPs también encontramos la proteína OipA, codificada por el gen *oipA*. Esta proteína se asocia con mayor riesgo de úlcera péptica y cáncer gástrico, pero el gen que la codifica tiene la peculiaridad de variar entre estados funcionales (*on*) y no funcionales (*off*) por un mecanismo de adición de dinucleótidos CT. Esto quiere decir

que el hecho de detectar la presencia del gen no implica necesariamente que se esté expresando. En nuestro caso, todas las cepas estudiadas presentaron el gen *oipA*, pero solo estaba completo en 11 de ellas, faltando en las otras 9 el inicio del gen. De las 11 cepas en las que se pudo determinar el estado *on/off* del gen, 9 presentaron estado *on* y 2 estado *off*. Sallas *et al.* detectaron el gen *oipA* por PCR en el 76% de las muestras estudiadas (151). Teniendo en cuenta que en nuestro caso, en 9 cepas faltaba el fragmento inicial del gen, nuestro estudio podría haber obtenido resultados similares de haber sido realizado mediante PCR si alguno de los cebadores hibrida en la región ausente. Además, Sallas *et al.* estudiaron el gen *oipA* de 10 cepas por secuenciación y observaron que en 7 de ellas (70%) el gen se encontraba en estado *on* y, en las restantes, en estado *off*. De forma análoga, en nuestro caso 9 de 11 cepas (81%) presentaron estado *on* y las restantes estado *off*. Como ya se había descrito previamente por otros autores (152) y tal y como describen Sallas *et al.*, las cepas de países occidentales tienen más de 5 repeticiones de dinucleóticos CT, al igual que en nuestro caso. El número de repeticiones CT más frecuente en las cepas con estado *on* y *off* también es consistente con lo descrito (152).

*H. pylori* presenta al menos cuatro sistemas de secreción tipo IV (SST4). El más conocido es *cagPAI*, ya discutido, pero los sistemas *comB*, *tfs3* y *tfs4* han sido objeto de estudio en los últimos años. En concreto, el sistema *comB* es imprescindible para transferencia horizontal de ADN y, tal y como se ha descrito, aparece prácticamente en todas las cepas (87), por lo que es congruente que en nuestro caso todas las cepas presenten los genes esenciales para su funcionamiento así como los genes *recA*, *dprA*, *comEC* y *comH*, que codifican proteínas relacionadas con el funcionamiento del sistema. Por otra parte, para los sistemas *tfs3* y *tfs4* los resultados obtenidos no concuerdan con

lo descrito en la bibliografía. En primer lugar, es llamativo el hecho de que en ninguna cepa se encontró el gen *dupA*. Esto puede ser una limitación del método de anotación, ya que las bases de datos recogen secuencias de baja calidad para este gen (incompletas, con codones de parada, etc.) que pueden no ser reconocidas por PROKKA. Al realizar un alineamiento frente a secuencias de *dupA* publicadas en la web del NCBI y los genomas completos de las 20 cepas, solo 5 cepas tuvieron alineamientos (todas entre 96 y 98%). Precisamente estas cinco cepas presentaron anotación para *VirB4-like protein* HP0441, lo que puede indicar que el alineamiento se deba a la elevada similitud entre *dupA* y el gen que codifica dicha proteína. Es reseñable el hecho de que los estudios publicados sobre prevalencia de *dupA* están basados en PCR, y se ha descrito que esta técnica tiene un bajo rendimiento (124) y cabría la opción de que debido a la existencia de varios homólogos de *virB4* en el genoma de *H. pylori* (173), se produzcan amplificaciones inespecíficas por PCR. Por otra parte, a pesar de que ocho de las cepas estudiadas presentaron anotación para *virB4*, ninguna de ellas presentó anotados todos los genes descritos como parte del *tsf3* ni *tsf4*. Además, la nomenclatura de los genes que forman parte de estos sistemas de secreción es compleja, lo que puede repercutir en las anotaciones. También el hecho de que estos dos sistemas de secreción se encuentren en regiones de plasticidad (174) puede dificultar el proceso de secuenciación. Por lo tanto, desde nuestra experiencia, la secuenciación de genoma completo no es un método práctico para analizar los sistemas de secreción *tsf3* y *tsf4*, aunque quizás con el aumento creciente de genomas de *H. pylori* publicados, se pueda refinar.

En el caso del gen *iceA*, tampoco se obtuvo ninguna cepa con anotación para el mismo. Igual que en el caso de *dupA*, los estudios publicados sobre este gen se basan en PCR y las secuencias completas depositadas en el NCBI son muy escasas (solamente tres

en el momento de realizar este trabajo). Al enfrentar los genomas de las 20 cepas a las tres secuencias *iceA* disponibles, se obtienen alineamientos de la longitud correcta y con porcentajes de similitud por encima del 88% en siete cepas. Por lo tanto, parece que la secuenciación de genoma completo presenta limitaciones a la hora de estudiar este factor de virulencia, pero con la perspectiva de que pueda ser útil a medida que se vayan publicando nuevas secuencias.

### 7.2.2. Genoma core, árbol filogenético y MLST

El estudio clásico de MLST implica realizar la amplificación mediante PCR de siete genes para cada cepa que se quiera estudiar y la posterior secuenciación de cada uno de los fragmentos amplificados. De este modo, se puede caracterizar el alelo de cada gen y determinar el ST al que pertenece cada cepa. Resulta evidente la laboriosidad técnica que supone realizar este tipo de estudios, teniendo en cuenta, además, que en el caso de *H. pylori*, el MLST no suele presentar buenos resultados, ya que se ha descrito que cada cepa de *H. pylori* es virtualmente un ST nuevo (102). El desarrollo de las herramientas bioinformáticas ha permitido que, sin necesidad de realizar el protocolo completo de MLST, se pueda asignar cada cepa a un ST siempre y cuando se disponga de la secuencia del genoma completo de la bacteria. En nuestro caso, solo dos de las 20 cepas se asignaron a un ST ya descrito, mientras que todas las demás fueron, como era de esperar, STs nuevos. Por lo tanto, esta herramienta no resulta especialmente útil en caso de *H. pylori*, pero sí resultaría útil en estudios sobre otros microorganismos donde el ST tenga implicaciones. En casos como el de *H. pylori*, donde la variabilidad genética es tan grande, resulta de utilidad el estudio de MLST a través del genoma core (el denominado cg-MLST), ya que en este caso, se analizan los alelos de todos los genes que son comunes a todas las cepas incluidas en el estudio, algo que sería impensable analizar

en base a reacciones de PCR. Dado que la cobertura del genoma pasa de siete a cientos de genes, los resultados son mucho más finos y ya han comenzado a aplicarse en estudios epidemiológicos (175,176). En nuestro caso, la representación mediante un árbol filogenético de las cepas analizadas en base a cg-MLST, añadiendo algunos de los factores de virulencia a la figura, permite observar que las cepas que aparecen más próximas en el árbol son aquellas que presentan la isla *cagPAI*, lo cual tiene sentido debido al gran tamaño que presenta dicha isla. Este hecho no podría haberse constatado mediante MLST clásico ya que, realmente, en el caso de *H. pylori*, es prácticamente imposible agrupar cepas mediante este sistema.

Aunque el genoma core de un grupo de cepas se puede utilizar, como ya se ha visto, para realizar estudios epidemiológicos, no está claro cuál es el número de genes que constituyen el genoma core a nivel de especie bacteriana. En *H. pylori*, se ha estimado, en un estudio con 107 genomas, que el genoma core está constituido por 244 genes (177), un número muy bajo teniendo en cuenta que un genoma de *H. pylori* tiene alrededor de 1566 genes y que, en el caso de *Campylobacter jejuni*, se estima que el genoma core estaría constituido por 866 de los 1623 genes que componen su genoma; es decir, más del triple que en *H. pylori*. En nuestro caso, analizando el genoma core de las 20 cepas secuenciadas, se obtiene un genoma core constituido por 1068 genes, número que desciende hasta 957 genes si se añaden al estudio una cepa representante de cada uno de los linajes de *H. pylori* descritos. Esto tiene sentido y corrobora lo que se observa en la representación del árbol filogenético: las 20 cepas son muy similares, por eso su genoma core (los genes que tienen en común) también es grande, pero disminuye notablemente si se incluyen en el estudio cepas de otros orígenes geográficos. Además, el número de genes totales presentes en el conjunto de las cepas (el pan-genoma)

aumenta notablemente al añadir las cepas de otros orígenes, lo que denota la enorme plasticidad del genoma de *H. pylori*, que se ha descrito como un genoma abierto, dado que el número de nuevos genes que se descubren con cada nuevo genoma analizado es elevado (174).

### 7.3.3. Limitaciones del estudio

El presente estudio sobre genomas completos cuenta con una serie de limitaciones. Por una parte, es un trabajo que incluye exclusivamente biopsias de pacientes pediátricos. Esto quiere decir que el tiempo de evolución de la infección no puede ser demasiado largo y además, se diagnostican y se tratan pronto, por lo que en nuestro caso no se reclutó ningún paciente con úlceras ni adenocarcinoma gástrico. El hecho de detectar en algunas cepas patrones de factores de virulencia que han sido asociados con el desarrollo de estas patologías en adultos, puede significar que quizás estos pacientes, de no haber sido tratados, hubiesen llegado a desarrollar úlceras o cáncer gástrico.

Por otra parte, el análisis bioinformático de las secuencias no nos permite diferenciar, en aquellos casos en los que no se obtiene anotación para un gen, si dicho gen está ausente, está presente pero no se ha secuenciado correctamente o está presente pero no se ha anotado correctamente. Para ello, realizar PCRs de comprobación con cebadores que hayan sido probados por otros autores, habría sido una buena forma de discernir al menos si la ausencia del gen es verdadera o no.

Por último, cabe destacar la limitación de tamaño de la muestra, así como la limitación geográfica, ya que todos los pacientes incluidos son occidentales y por lo tanto estos resultados no deberían extrapolarse más allá de la región del estudio.

### 7.3. Microbioma

#### 7.3.1. Análisis del microbioma gástrico en función del estado *H. pylori*

El descubrimiento de *H. pylori* en 1982, acabó con el dogma de la esterilidad del estómago. Este hallazgo también llevó a razonar que si una especie bacteriana podía sobrevivir en semejantes condiciones de acidez, quizás otras también podrían hacerlo. En los siguientes años se llevaron a cabo varios estudios en este sentido y, efectivamente, se detectaron bacterias en el estómago. De hecho, se cree que existe un microbioma core en adultos sanos, que estaría dominado por los géneros *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia* y *Haemophilus* y sujeto a cambios debido a los hábitos dietéticos, la toma de medicación, inflamación gástrica y, por supuesto, la presencia de *H. pylori* (146).

En nuestro estudio, el primer paso fue comprobar que, efectivamente, era posible detectar ADN bacteriano en las muestras de biopsia gástrica y que al normalizar la densidad bacteriana por número de células humanas, esta era diferente entre los pacientes *H. pylori* positivos y negativos. Al comparar la alfa diversidad entre ambos grupos de pacientes, se observó que la diversidad es mayor en el grupo de los pacientes *H. pylori* negativos mediante la tecnología MiSeq al analizar el número de OTUs observadas y el índice de Shannon, pero no al analizar la distancia filogenética ni en ninguna medida de alfa diversidad mediante tecnología Roche. Klymiuk *et al.* (178), en un estudio similar pero que analizaba por separado los pacientes con cepas *cagA* positivas, encontraron diferencias al comparar la alfa diversidad de pacientes *H. pylori* negativos frente a los portadores de cepas *cagA* positivas, pero no frente a los que presentaban cepas *cagA* negativas. En nuestro caso, si bien no se dispone de ese dato, es de esperar que, teniendo en cuenta la prevalencia de *cagA* en nuestro medio, solo



alrededor de dos pacientes hubiesen tenido cepas *cagA* positivas. En un estudio similar a este utilizando tecnología MiSeq, Llorca *et al.* (179) también describieron diferencias estadísticamente significativas a nivel de OTUs observadas entre ambos grupos de pacientes.

A nivel de beta diversidad, se observan diferencias significativas al comparar ambos grupos en función del resultado del cultivo para *H. pylori* por ambas técnicas, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Llorca *et al.* (179) obtuvieron los mismos resultados pero solo en el análisis cuantitativo en función del estado de *H. pylori*. En conjunto, parece que el hecho de tener o no infección por *H. pylori* provoca variaciones en el microbioma gástrico tanto a nivel de presencia/ausencia de determinados grupos como a nivel de cantidad de microorganismos presentes dentro de cada uno de los grupos. Este último resultado está ligado al hecho de que varias muestras tienen más de un 90% de secuencias de *Helicobacter*.

Se observan diferencias significativas al comparar los hallazgos histológicos tanto a nivel cualitativo como cuantitativo únicamente en el caso del análisis mediante tecnología MiSeq. Se observa una agrupación de muestras provenientes de pacientes con gastritis. Las biopsias B9, B10, B11, B12 y B15, todas ellas pertenecientes a pacientes *H. pylori* negativos y con gastritis, agruparon con aquellas pertenecientes a pacientes *H. pylori* negativos y sin gastritis, lo que evidencia que es la presencia de *H. pylori* y las alteraciones de la microbiota que esta pueda provocar lo que motiva que dichas muestras agrupen entre sí.

Uno de los pacientes, clasificado como *H. pylori* positivo (B29), no presentaba gastritis y se agrupa, a nivel de beta diversidad cualitativa, con los pacientes *H. pylori* negativos. Esta muestra tiene la peculiaridad de tener tan solo un 4% de secuencias de

*Helicobacter* y, al revisar los datos microbiológicos disponibles, fue una cepa identificada únicamente por morfología de la colonia, que no fue viable y no se pudo someter a más estudios, por lo que no puede descartarse un falso positivo.

El análisis de la composición taxonómica evidenció la existencia de una microbiota rica y compleja, con diferencias entre los pacientes *H. pylori* negativos y positivos. Como ya se había descrito en niños (179) y también en adultos (178,180), los filos predominantes en ausencia de infección por *H. pylori* son Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria. Klymiuk *et al.* (178) describieron que, en los pacientes *H. pylori* positivos, la microbiota está dominada por el filo Proteobacteria mientras que en los negativos lo está por el filo Firmicutes; sin embargo, en nuestro estudio este dato se puede comprobar solo en el análisis mediante tecnología 454 pero no mediante MiSeq, como también describieron Llorca *et al.* (179). Cabe destacar que, recientemente, la clase *Epsilonproteobacteria*, que engloba, entre otros, a *H. pylori*, ha sido reclasificada en un nuevo filo denominado Campylobacterota (54,55). En el momento del análisis de nuestros resultados, las bases de datos no se encontraban aún actualizadas.

Llorca *et al.* (179) describen, por este orden, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* como los géneros predominantes en las biopsias de pacientes *H. pylori* positivos y *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Escherichia/Shigella*, como los predominantes en biopsias de pacientes *H. pylori* negativos. Klymiuk *et al.* (178) describen predominio de *Helicobacter* y *Streptococcus* en las muestras de pacientes *H. pylori* positivos, *cagA* positivos, *Helicobacter*, *Streptococcus* y *Prevotella* en las muestras de pacientes *H. pylori* positivos, *cagA* negativos y *Streptococcus*, *Prevotella* y *Enterococcus* en las biopsias de pacientes *H. pylori* negativos. Nuestros resultados

concuerdan mayoritariamente con los de este último estudio, ya en el grupo de pacientes *H. pylori* positivos, *Helicobacter* y *Streptococcus*, fueron los géneros dominantes, seguidos de *Prevotella* en el caso del análisis mediante tecnología MiSeq. En el caso de las muestras de pacientes *H. pylori* negativos, *Streptococcus* fue el género dominante, seguido de *Helicobacter* y *Prevotella*.

Es muy llamativa la presencia de un porcentaje elevado de secuencias de *Helicobacter* tanto en el análisis 454 como en MiSeq en los pacientes *H. pylori* negativos. Se revisaron a fondo las historias clínicas de los pacientes correspondientes a las muestras B15, B16, B18 y B19, por ser todos ellos pacientes clasificados como *H. pylori* negativos pero con un porcentaje de secuencias de *Helicobacter* elevado tanto por MiSeq como por 454. En primer lugar, cabe señalar que la longitud de las secuencias no permite su clasificación a nivel de especie, por lo que existe la posibilidad de que se trate de secuencias de otras especies del género *Helicobacter*, como ya han descrito otros autores (181); sin embargo, el hecho de que sean porcentajes elevados y, tras la revisión de la historia clínica, una posibilidad es que se trate de pacientes con infección no diagnosticada. En concreto, el paciente B16 fue diagnosticado y tratado para *H. pylori* tres años antes de la inclusión en este estudio. En el momento del estudio, la histología de la biopsia era normal y el cultivo negativo, pero se observaba una gastritis nodular típica de la infección por *H. pylori*, que no confirma el diagnóstico de infección ya que puede persistir tras ser erradicada la bacteria.

### 7.3.2. Análisis del microbioma gástrico: comparativa entre dos técnicas.

El rápido desarrollo de las técnicas de NSG ha propiciado que varias plataformas diferentes convivan en el mercado. La secuenciación masiva comenzó a aplicarse al

estudio del microbioma sin que existiesen protocolos estandarizados para ello y por eso es importante tener en cuenta que los resultados pueden no ser del todo comparables.

Uno de los objetivos de este trabajo es, precisamente, comparar los resultados obtenidos al estudiar las mismas muestras mediante dos plataformas NGS diferentes. Al analizar los resultados, se observan diferencias en la alfa y beta diversidad (resultados estadísticamente significativos con la plataforma MiSeq pero no con 454) y a nivel de taxonomía (variación en los filos y géneros mayoritarios).

Son muchos los factores a tener en cuenta: el almacenamiento de las muestras hasta su procesamiento, el método de extracción de ácidos nucleicos, los cebadores utilizados para amplificar el ARNr 16S, la región del gen elegida, la plataforma de secuenciación y los algoritmos de análisis utilizados, entre otros (182,183). En nuestro caso, todas las muestras tuvieron las mismas condiciones de almacenamiento, extracción y análisis de secuencias, por lo que, en ese sentido, serían directamente comparables entre sí, pero no con otros estudios.

El uso de diferentes cebadores para amplificar el gen ARNr 16S y la región de este que se haya decidido amplificar son dos puntos que pueden explicar parte de nuestros resultados, ya que se ha descrito que algunas parejas de cebadores tienen más afinidad por determinados grupos bacterianos (184) y que la elección de la región del ARNr 16S también tiene efectos en la clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas, siendo la región V4 la que parece permitir una clasificación taxonómica óptima (185). Además, un estudio (186) realizado con una comunidad bacteriana sintética concluyó que la plataforma MiSeq generaba secuencias de mejor calidad y con posibilidad de mejores medidas de control de calidad que 454. También concluyeron que la elección de los cebadores tiene más efecto en los resultados de abundancia obtenidos que el tipo de

plataforma utilizada y que el análisis de beta diversidad es estable al margen de ambos factores. Estos resultados, concuerdan con los que se obtienen en el presente trabajo, ya que, si bien existen notables diferencias en el análisis taxonómico, a nivel de beta diversidad los resultados son muy similares.

### 7.3.3. Análisis de la actividad transcripcional

Una de las grandes limitaciones de los estudios de microbioma basados en la detección del gen ARNr 16S es que no permite diferenciar bacterias vivas y activas de aquellas que pueden estar en el estómago de forma transitoria o incluso muertas. Uno de los objetivos de este trabajo consistió en analizar la actividad transcripcional en base al ARNr 16S. Según nuestros resultados, se detectan bacterias transcripcionalmente activas tanto en muestras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos como negativos. Este hallazgo no descarta, *a priori*, que se trate de comunidades transitorias, pero es cierto que el hecho de trabajar sobre biopsia implica que las bacterias estaban unidas a la mucosa gástrica, lo que incita a pensar que se trata de comunidades establecidas. Es llamativa la detección de secuencias de ARN y ADN de *Helicobacter* en los pacientes *H. pylori* positivos y también que el ratio de actividad (secuencias ARN/secuencias ADN) para *Helicobacter* sea más elevado en los pacientes *H. pylori* negativos. Thorell *et al.* (187) obtuvieron resultados muy similares a los nuestros en el que fue el primer estudio publicado sobre actividad transcripcional del microbioma gástrico. De hecho, describen entre un 4 y un 63% de secuencias de ARN de *Helicobacter* en pacientes *H. pylori* negativos (en nuestro estudio se obtuvo de media un 10%) y discuten sobre la posibilidad de que *H. pylori* esté presente a bajos niveles en una gran mayoría de la población o bien que existan infecciones de bajo nivel por *H. pylori*.

En nuestros resultados también se observa que, en los individuos *H. pylori* positivos, *Streptococcus*, *Veillonella* y *Prevotella* tienen mayores ratios de actividad que *Helicobacter*; mientras que en los individuos *H. pylori* negativos, es *Helicobacter* quien presenta un mayor ratio de actividad. Como hipótesis, este fenómeno podría deberse al hecho de que en los pacientes *H. pylori* negativos, *Helicobacter* estaría transcripcionalmente muy activo, con la intención de poder replicarse y colonizar la mucosa gástrica, mientras que en los pacientes *H. pylori* positivos, *Helicobacter*, en un ambiente de infección establecida y elevada densidad poblacional, mantendría unos niveles basales de transcripción. Por su parte, otros géneros como *Streptococcus*, *Veillonella* y *Prevotella*, aumentarían sus niveles de transcripción para intentar recolonizar el nicho ecológico perdido.

#### 7.3.4. Limitaciones del estudio

La principal limitación de este estudio es el reducido tamaño de la muestra estudiada, que puede enmascarar o sobredimensionar determinados parámetros.

Por otra parte, el hecho de no haber podido caracterizar algunos factores de virulencia de las cepas de los pacientes *H. pylori* positivos, para analizar el microbioma gástrico en función de los mismos.

A nivel del estudio de los microorganismos transcripcionalmente activos, el hecho de no haber podido incluir todas las muestras en el análisis debido a problemas técnicos así como la posibilidad de que exista algún tipo de artefacto técnico hacen que estos resultados deban ser interpretados con cautela y se requieran estudios futuros que permitan obtener más evidencia.

#### 7.4. Consideraciones finales: aplicación de NGS al estudio de la infección por *H. pylori*.

El uso de las técnicas de secuenciación masiva en el ámbito de la microbiología clínica está, probablemente, a pocos pasos de llegar a ser cotidiano. A medida que los precios bajan, cada vez más centros pueden disponer de acceso a esta tecnología.

En el campo de la infección por *H. pylori*, la secuenciación de genomas completos permite obtener mediante una única técnica toda la información posible acerca de la secuencia del genoma. Esto permite tener un acceso permanente a los genomas secuenciados, lo que facilita enormemente realizar estudios con un gran número de cepas, que se pueden utilizar para diversos análisis en cualquier momento sin necesidad de volver a realizar trabajo de laboratorio. Ahora bien, el análisis de los genomas no es sencillo. Hay que tener en cuenta que algunos genes pueden estar presentes pero no anotados, estar anotados pero no ser expresados por la cepa, etc. En este sentido, el desarrollo de plataformas de análisis relativamente automatizadas y estandarizadas podría permitir una aplicación real de la secuenciación de genoma completo a los pacientes afectados por *H. pylori*, de modo que se pudiera informar de la virulencia de la cepa en un tiempo clínicamente razonable.

También a nivel epidemiológico, la NGS tiene mucho que aportar, ya que el hecho de hacer análisis filogenéticos basados en pan-genomas permite apreciar relaciones que no eran posibles hasta ahora.

Por último, la NGS ha abierto la puerta al conocimiento profundo del microbioma gástrico. Cada vez son más los estudios publicados y, probablemente, la evidencia científica acabará por ser suficiente como para poder tomar decisiones clínicas respecto

a un paciente con infección por *H. pylori* en función de las alteraciones que presente su microbioma gástrico en el momento del diagnóstico.

Para todo ello, la estandarización de los métodos y el desarrollo de algoritmos bioinformáticos de análisis que puedan ser utilizados por personas sin conocimientos informáticos profundos, son imprescindibles para que las técnicas de secuenciación masiva puedan ser una técnica de referencia en el ámbito de la microbiología clínica.



## CONCLUSIONES

---

## 8. CONCLUSIONES

1. La elevada prevalencia de cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina en nuestro medio refuerza la importancia de disponer del antibiograma de la cepa que produce infección en un paciente antes de iniciar el tratamiento y de un plan nacional de uso de antibióticos.
2. Las cepas incluidas en nuestro estudio, procedentes de pacientes pediátricos, son poco virulentas (mayoritariamente *cagA* negativas y con patrones de *vacA* asociados a menor virulencia).
3. El genoma *core* de *H. pylori* comprende un bajo porcentaje (24%) del total de genes presentes en su cromosoma y disminuye al incorporar cepas de diversos orígenes geográficos al análisis.
4. Las cepas de *H. pylori* son genéticamente diversas y no presentan, en general, relaciones filogenéticas entre ellas. Las cepas de nuestro estudio se agrupan en el árbol filogenético de acuerdo con la presencia de la isla *cagPAI*. Estas cepas presentan perfiles de menor resistencia.
5. La densidad bacteriana normalizada por célula humana analizada mediante PCR a tiempo real es diferente entre pacientes *H. pylori* positivos y *H. pylori* negativos.

6. La diversidad alfa del microbioma gástrico de los pacientes *H. pylori* positivos es inferior a la de los pacientes *H. pylori* negativos si se analiza mediante tecnología MiSeq (Illumina).
7. La diversidad beta del microbioma gástrico muestra que los pacientes *H. pylori* positivos y *H. pylori* negativos se agrupan de acuerdo con los componentes principales en el análisis por 454 (Roche) y MiSeq (Illumina).
8. La diversidad beta del microbioma gástrico es diferente en función de los hallazgos histológicos en el análisis mediante MiSeq (Illumina).
9. El análisis taxonómico revela un predominio de los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria tanto en los pacientes *H. pylori* positivos como en los negativos.
10. *Helicobacter* es el género predominante en las muestras de pacientes *H. pylori* positivos y *Streptococcus* en los pacientes *H. pylori* negativos, independientemente de la plataforma de secuenciación utilizada.
11. El uso de las dos plataformas de secuenciación con diferentes protocolos implica diferencias en los resultados, fundamentalmente a nivel de alfa diversidad y análisis de la composición taxonómica.

12. Es posible detectar secuencias de ARN bacteriano en biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *H. pylori* que orientan a pensar en una comunidad bacteriana estable y activa en el estómago.

## BIBLIOGRAFÍA

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. PNAS. 1977;74(2):560-4.
2. Claros G. Aproximación histórica a la biología molecular a través de sus protagonistas, los conceptos y la terminología fundamental. Panacea. 2003;4(12):168-179.
3. Reza MTR. La secuenciación del DNA: consideraciones históricas y técnicas. Revista Colombiana de Biotecnología. 2014;16(1):5-8.
4. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet. 2016;17(6):333-51.
5. Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. PLoS ONE. 2011;6(11):e28240.
6. Picelli S, Björklund ÅK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. Genome Res. 2014;24(12):2033-40.
7. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11(1):31-46.
8. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010;7(5):335-6.
9. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 2014;42(D1):D633-42.
10. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Čech M, *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. Nucleic Acids Res. 2018;46(W1):W537-44.
11. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455-77.
12. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068-9.
13. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

14. Center for Genomic Epidemiology [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.genomicepidemiology.org/>
15. Liu Y-Y, Chiou C-S, Chen C-C. PGADB-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. *Sci Rep*. 2016;6:36213.
16. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W242-5.
17. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, *et al*. Reprint of "Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention". *J Biotechnol*. 2017;250:2-10.
18. Marshall BJ. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. In: Mobey HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
19. Kidd M, Modlin IM. A Century of *Helicobacter pylori*. *Digestion*. 1998;59(1):1–15.
20. Cohn F. Untersuchungen über Bakterien. *Beitr Biol Pflanzen*. 1872;1(Heft 1):127-224.
21. Bottcher G. *Dorpat Med Z*. 1875;184.
22. Klebs C. Über Infectiöse Magenaffectionen. *Allgemein Wien Med Z*. 1881;29/30.
23. Jaworski W. Podręcznik chorób żołądka i dyetyki szczegółowej [Internet]. nakł. Wydawnictwa Dziel Lekarskich Polskich; 1899.
24. Boas I. *Diseases of the stomach*. Philadelphia, Davis; 1907.
25. Letulle M. Origine infectieuse de certains ulcères simples de l'estomac ou du duodénum. *Soc Méd Hôp Paris*. 1888;5:360.
26. Bizzozero G. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut Dritte Mittheilung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1893;42(1):82-152.
27. Salomon H. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralbl Bakteriol*. 1896;19:433-42.
28. Krienitz W. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wschr* 28:872. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1906;32(22):872-872.
29. Turck FB. Ulcer of the stomach: pathogenesis and pathology experiments in producing artificial gastric ulcer and genuine induced peptic ulcer. *JAMA*. 1906;XLVI(23):1753-63.

30. Turck FB. Experimental studies on round ulcer of the stomach and duodenum. J Med Res. 1908;17(4):365.
31. Rosenow EC. The production of ulcer of the stomach by injection of streptococci. JAMA. 1913;61(22):1947-50.
32. Rosenow EC. The causation of gastric and duodenal ulcer by streptococci plates 5 TO 14. J Infect Dis. 1916;19(3):333-74.
33. Rosenow EC. The Specificity of the *Streptococcus* of gastroduodenal ulcer and certain factors determining its localization on JSTOR. J Infect Dis. 1923;33:248.
34. Dragstedt LR. Contributions to the physiology of the stomach: XXXVIII. Gastric juice in duodenal and gastric ulcers. JAMA. 1917;LXVIII(5):330-3.
35. Edkins JS. *Spirella regaudi* in the cat. Parasitology. 1923;15:296-307.
36. Doenges J. Spirochetes in gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. Proc Soc Exp Med Biol. 1938;38:536-8.
37. Freedberg AS, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. Am J Dig Dis. 1940;7(10):443-5.
38. Palmer ED. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. Gastroenterology. 1954;27(2):218-20.
39. Luck J, Seth T. Gastric Urease. Biochem J. 1924;18(6):1227-31.
40. Luck JM, Seth TN. The physiology of gastric urease. Biochemical J. 1925;19(3):357.
41. Conway E. The Biochemistry of gastric acid secretion. Springfield, Thomas. 1952.
42. Fitzgerald O, Murphy. Role of gastric urease. Nature. 1948;162(4127):896.
43. Steer HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. J Clin Path. 1975;28(8):639.
44. Robin Warren J, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium, in active chronic gastritis. Lancet. 1983.321(8336):1273-5.
45. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 323(8390):1311-5.
46. Marshall BJ, Armstrong J, McGeachie D, Glancy R. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. Med J Aust. 1985;142(8):436-9.
47. Morris A, Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. Am J Gastroenterol. 1987;82(3):192-9.
48. López-Brea, M., Jiménez, M.L., Blanco, M., Pajares, J.M. *Campylobacter* en patología gástrica. Microbiología 1985; 1: 95-97.



49. Borody TJ, Cole P, Noonan S, Morgan A, Lenne J, Hyland L, *et al.* Recurrence of duodenal ulcer and *Campylobacter pylori* infection after eradication. *Med J Aust*; 1989; 151(8):431-5.
50. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1989;39(4):397–405.
51. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *JAMA.* 1994;272(1):65-9.
52. International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994.
53. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005 [Internet]. [citado 27 de junio de 2016]. Disponible en: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/)
54. Waite DW, Vanwonderghem I, Rinke C, Parks DH, Zhang Y, Takai K, *et al.* Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front Microbiol.* 2017;8:682.
55. Waite DW, Vanwonderghem I, Rinke C, Parks DH, Zhang Y, Takai K, *et al.* Addendum: Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front Microbiol.* 2018;9:772.
56. Pfaller MA, Richter SS, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Carroll KC, *et al.*, editores. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition [Internet]. American Society of Microbiology; 2015 [citado 29 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381>
57. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997;388(6642):539-47.
58. Alm RA, Ling L-SL, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1999;397(6715):176-80.
59. Thorell K, Lehours P, Vale FF. Genomics of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2017;22:e12409.
60. Alm RA, Trust TJ. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med.* 1999;77(12):834-46.

61. *Helicobacter pylori* Genome Project - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 2 de junio de 2019]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02788214>
62. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J. 2016;39(1):14-23.
63. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 5):545-53.
64. Yang X, Li H, Cheng T, Xia W, Lai Y-T, Sun H. Nickel translocation between metallochaperones HypA and UreE in *Helicobacter pylori*. Metallomics. 2014;6(9):1731-6.
65. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Singh S, Feng J, Sachs G. Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with UreI, a channel for urea and its metabolites, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2010;192(1):94-103.
66. Miller EF, Maier RJ. Ammonium metabolism enzymes aid *Helicobacter pylori* acid resistance. J Bacteriol. 2014;196(17):3074-81.
67. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science. 2000;287(5452):482-5.
68. Schwartz JT, Allen L-AH. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. J Leukoc Biol. 2006;79(6):1214-25.
69. Pflock M, Finsterer N, Joseph B, Mollenkopf H, Meyer TF, Beier D. Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. J Bacteriol. 2006;188(10):3449-62.
70. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infect Immun. 1996;64(7):2445-8.
71. Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. J Bacteriol. 1999;181(22):6969-76.
72. Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. Annu Rev Microbiol. 2011;65(1):389-410.
73. Niehus E, Gressmann H, Ye F, Schlapbach R, Dehio M, Dehio C, *et al.* Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 2004;52(4):947-61.
74. Oleastro M, Ménard A. The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. Biology. 2013;2(3):1110-34.

75. Roesler, Rabelo Gonçalves EMA, Zeitune JMR. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: a review. Clin Med Insights Gastroenterol. 2014;9.
76. Zambon C-F, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. J Clin Pathol. 2003;56(4):287-91.
77. Sheu B-S, Odenbreit S, Hung K-H, Liu C-P, Sheu S-M, Yang H-B, *et al.* Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen. Am J Gastroenterol. 2006;101(1):36-44.
78. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (OipA) of *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(13):7533-8.
79. Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low-molecular-weight (33-35 K) antigen. Dig Dis Sci. 1998;43(7):1482-7.
80. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. Nat Rev Microbiol. 2007;5(6):441-52.
81. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat Rev Cancer. 2004;4(9):688-94.
82. Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A Tale of Two Toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. Front Microbiol. 2010;1:115.
83. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;7(11):629-41.
84. Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. Future Microbiol. 2015;10:955-65.
85. Johnson EM, Gaddy JA, Voss BJ, Hennig EE, Cover TL. Genes required for assembly of pili associated with the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Infect Immun. 2014;82(8):3457-70.
86. Karnholz A, Hoefler C, Odenbreit S, Fischer W, Hofreuter D, Haas R. Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2006;188(3):882-93.
87. Yuan X-Y, Wang Y, Wang M-Y. The type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. Future Microbiol. 2018;13(9):1041-54.

88. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008;134(1):306-23.
89. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:92.
90. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17771-7.
91. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Hosseini ME, *et al*. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(3):926-36.
92. Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, *et al*. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11250-9.
93. Thi Huyen Trang T, Thanh Binh T, Yamaoka Y. Relationship between vacA types and development of gastroduodenal diseases. *Toxins (Basel)*. 2016;8(6).
94. Huang X, Deng Z, Zhang Q, Li W, Wang B, Li M. Relationship between the iceA gene of *Helicobacter pylori* and clinical outcomes. *Ther Clin Risk Manag*. 2016;12:1085-92.
95. Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. 2006;61(4):847-60.
96. Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson H-O, Stubbs KA, *et al*. Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2016;21(6):445-461.
97. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. Whitfield C, editor. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40(4):480-93.
98. Montano V, Didelot X, Foll M, Linz B, Reinhardt R, Suerbaum S, *et al*. Worldwide population structure, long-term demography, and local adaptation of *Helicobacter pylori*. *Genetics*. 2015;200(3):947-63.
99. Falush D. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003;1080857(1582):299.
100. Martín de Argila C, Boxeida D. Epidemiología y factores de riesgo. *Helicobacter pylori* y enfermedades relacionadas. 2004;251-5.

101. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: A systematic review of studies with national coverage. Dig Dis Sci. 2014;59(8):1698-709.
102. Mégraud F, Lehours P, Vale FF. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. Clin Microbiol Infect. 2016;22(11):922-7.
103. Hall BG, Ehrlich GD, Hu FZ. Pan-genome analysis provides much higher strain typing resolution than multi-locus sequence typing. Microbiology. 2010;156(4):1060-8.
104. Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R. The microbial pan-genome. Curr Opin Genet Dev. 2005;15(6):589-94.
105. De Falco M, Lucariello A, Iaquinto S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* pathogenesis. J Cell Physiol. 2015;230(8):1702-7.
106. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449-90.
107. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res. 1992;52(24):6735–6740.
108. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. J Dig Dis. 2012;13(1):2-9.
109. Park SK. Extra-digestive manifestations of *Helicobacter pylori* infection – An overview. En: Roesler BM, editor. Extradigestive manifestations of *Helicobacter pylori* Infection - An overview. InTech; 2016.
110. Satoh H, Saijo Y, Yoshioka E, Tsutsui H. *Helicobacter pylori* infection is a significant risk for modified lipid profile in Japanese male subjects. J Atheroscler Thromb. 2010;17(10):1041-8.
111. Buzás GM. Metabolic consequences of *Helicobacter pylori* infection and eradication. World J Gastroenterol. 2014;20(18):5226-34.
112. Harvey R, Lane A, Murray L, Harvey I, Nair P, Donovan J. Effect of *Helicobacter pylori* infection on blood pressure: a community based cross sectional study. BMJ. 2001;323(7307):264-5.
113. Eshraghian A, Eshraghian H, Ranjbar Omrani G. Insulin resistance and metabolic syndrome: is *Helicobacter pylori* criminal? Minerva Gastroenterol Dietol. 2011;57(4):379-85.
114. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The association between *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance: a systematic review. Helicobacter. 2011;16(2):79-88.

115. Nabipour I, Vahdat K, Jafari SM, Pazoki R, Sanjdideh Z. The association of metabolic syndrome and *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1: the Persian Gulf Healthy Heart Study. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:25.
116. Mayr M, Kiechl S, Mendall MA, Willeit J, Wick G, Xu Q. Increased risk of atherosclerosis is confined to CagA-positive *Helicobacter pylori* strains: prospective results from the Bruneck study. *Stroke*. 2003;34(3):610-5.
117. Shi W-J, Liu W, Zhou X-Y, Ye F, Zhang G-X. Associations of *Helicobacter pylori* infection and cytotoxin-associated gene A status with autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Thyroid*. 2013;23(10):1294-300.
118. Gu H, Li L, Gu M, Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria: a meta-analysis. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:486974.
119. Lionetti E, Leonardi S, Lanzafame A, Garozzo MT, Filippelli M, Tomarchio S, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and atopic diseases: is there a relationship? A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(46):17635-47.
120. Wang F, Liu J, Zhang Y, Lei P. Association of *Helicobacter pylori* infection with chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: a meta-analysis of 16 studies. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47(9):597-603.
121. Su J, Zhou X-Y, Zhang G-X. Association between *Helicobacter pylori* infection and migraine: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14965-72.
122. Urrego Díaz JA, Otero Regino W, Gómez Zuleta M. *Helicobacter pylori* and hematologic diseases. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2013;28(4):329-37.
123. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, *et al*. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. 2012;61(5):646-64.
124. Wang Y-K. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*. 2015;21(40):11221.
125. Lee T-H, Lin C-C, Chung C-S, Lin C-K, Liang C-C, Tsai K-C. Increasing biopsy number and sampling from gastric body improve the sensitivity of rapid urease test in patients with peptic ulcer bleeding. *Dig Dis Sci*. 2015;60(2):454-7.
126. Gisbert JP, Abaira V. Accuracy of *Helicobacter pylori* diagnostic tests in patients with bleeding peptic ulcer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(4):848-63.
127. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

- Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Sociedad Española de Microbiología; 2004.
128. Gisbert JP, de la Morena F, Abaira V. Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(8):1921-30.
  129. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. WHO. [citado 5 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
  130. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(2):212-39.
  131. Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, Bermejo F, Bujanda L, Calvet X, *et al*. IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol*. 2016;39(10):697-721.
  132. Alba C, Blanco A, Alarcón T. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis*. 2017;30(5):489-97.
  133. Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, Domingo D, Llorca L, Correa A, *et al*. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(5):278-82.
  134. EUCAST: EUCAST [Internet]. [citado 13 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.eucast.org/>
  135. Shop for Microbiology Standards & AST Guidelines - CLSI [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. [citado 13 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/>
  136. Knight R, Callewaert C, Marotz C, Hyde ER, Debelius JW, McDonald D, *et al*. The microbiome and human biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2017;18(1):65-86.
  137. NIH Human Microbiome Project - Home [Internet]. [citado 10 de enero de 2019]. Disponible en: <https://hmpdacc.org/hmp/>
  138. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*. 2018;67(9):1716-25.
  139. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3(1):31, s40168-015-0094-5.
  140. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med*. 2018;24(4):392-400.



141. Gritz EC, Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: A Brief Review. *Front Pediatr*. 2015; 5;3:17.
142. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The human microbiota in health and disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
143. Hu Z, Zhang Y, Li Z, Yu Y, Kang W, Han Y, *et al*. Effect of *Helicobacter pylori* infection on chronic periodontitis by the change of microecology and inflammation. *Oncotarget*. 2016;7(41):66700-12.
144. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, *et al*. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):207-15.
145. Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang X, Cai D, *et al*. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science*. 2017;358(6369):1443-8.
146. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol J*. 2015;3(3):255-60.
147. Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(4):557-78.
148. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161-81.
149. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, *et al*. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):e1.
150. Xia Y, Yamaoka Y, Zhu Q, Matha I, Gao X. A Comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. Ahmed N, editor. *PLoS ONE*. 2009;4(11):e7736.
151. Sallas ML, Dos Santos MP, Orcini WA, David ÉB, Peruquetti RL, Payão SLM, *et al*. Status (on/off) of *oipA* gene: their associations with gastritis and gastric cancer and geographic origins. *Arch Microbiol*. 2019;201(1):93-7.
152. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AHM, *et al*. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *hopH* gene polymorphisms. *J Infect Dis*. 2006;194(10):1346-55.
153. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, *et al*. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355-61.



154. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 2018;3:124.
155. López-Brea M, Martínez MJ, Domingo D, Alarcón T. A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. J Antimicrob Chemother. 2001;48(2):295-7.
156. Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, *et al.* Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut. 2006;55(12):1711-6.
157. Macías-García F, Llovo-Taboada J, Díaz-López M, Bastón-Rey I, Domínguez-Muñoz JE. High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from dyspeptic patients: A prevalence cross-sectional study in Spain. Helicobacter. 2017;22(6).
158. Di Giulio M, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Cataldi V, Marzio L, Grossi L, *et al.* In vitro antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to nine antibiotics currently used in Central Italy. Scand J Gastroenterol. 2016;51(3):263-9.
159. Chen D, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Mandrekar JN, Patel R. Phenotypic and molecular antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(4).
160. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. Gastroenterology. 2018;155(5):1372-1382.e17.
161. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, *et al.* *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut. 2013;62(1):34-42.
162. Lee JW, Kim N, Nam RH, Lee SM, Kwon YH, Sohn SD, *et al.* Favorable outcomes of culture-based *Helicobacter pylori* eradication therapy in a region with high antimicrobial resistance. Helicobacter. 2019;24(2):e12561.
163. Šterbenc A, Poljak M, Zidar N, Luzar B, Homan M. Prevalence of the *Helicobacter pylori* *hxA* and *hxB* genes and their correlation with histological parameters in children. Microb Pathog. 2018;125:26-32.
164. Almeida N, Donato MM, Romãozinho JM, Luxo C, Cardoso O, Cipriano MA, *et al.* Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. Dig Dis Sci. 2015;60(1):74-85.
165. Díaz-Reganon J, Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Susceptibility of 36 *Helicobacter pylori* clinical isolates to four first-line antibiotics and virulence factors. Rev Esp Quimioter. 2006;19(1):34-8.

166. Kauser F, Khan AA, Hussain MA, Carroll IM, Ahmad N, Tiwari S, *et al.* The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5302-8.
167. Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T, López-Brea M. High Prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3703-7.
168. Brennan DE, Dowd C, O'Morain C, McNamara D, Smith SM. Can bacterial virulence factors predict antibiotic resistant *Helicobacter pylori* infection? *World J Gastroenterol.* 2018;24(9):971-81.
169. Torres LE, González L, Melián K, Alonso J, Moreno A, Hernández M, *et al.* EPIYA motif patterns among Cuban *Helicobacter pylori* CagA positive strains. *Biomédica.* 2012;32(1):23-31.
170. Saribas S, Caliskan R, Erdamar Cetin S, Yuksel P, Sami Kocazeybek B, Ergin S, *et al.* Patterns of EPIYA motifs among *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains: a case-control study in a Turkish population with Eurasian geographical features. *J Med Microbiol.* 2015;64(10):1117-23.
171. Li Q, Liu J, Gong Y, Yuan Y. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(17).
172. Zhang X-S, Tegtmeyer N, Traube L, Jindal S, Perez-Perez G, Sticht H, *et al.* A specific A/T polymorphism in Western tyrosine phosphorylation B-motifs regulates *Helicobacter pylori* CagA epithelial cell interactions. Blanke SR, editor. *PLOS Pathogens.* 2015;11(2):e1004621.
173. LU H, HSU P, GRAHAM DY, YAMAOKA Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2005;128(4):833-48.
174. Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, *et al.* Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(18):6089-101.
175. Kimura B. Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? *Food Microbiol.* 2017; 75:28-36.
176. Ford L, Carter GP, Wang Q, Seemann T, Sintchenko V, Glass K, *et al.* Incorporating whole-genome sequencing into public health surveillance: lessons from prospective sequencing of *Salmonella* Typhimurium in Australia. *Foodborne Pathog Dis.* 2018;15(3):161-7.
177. van Tonder AJ, Mistry S, Bray JE, Hill DMC, Cody AJ, Farmer CL, *et al.* Defining the estimated core genome of bacterial populations using a bayesian decision model. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(8).

178. Klymiuk I, Bilgiler C, Stadlmann A, Thannesberger J, Kastner M-T, Högenauer C, *et al.* The human gastric microbiome is predicated upon Infection with *Helicobacter pylori*. *Front Microbiol.* 2017;8:2508.
179. Llorca L, Pérez-Pérez G, Urruzuno P, Martinez MJ, Iizumi T, Gao Z, *et al.* Characterization of the gastric microbiota in a pediatric population according to *Helicobacter pylori* status. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(2):173-8.
180. Sheh A, Fox JG. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes.* 2013;4(6):505-31.
181. Yang I, Nell S, Suerbaum S. Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(5):736-61.
182. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, *et al.* Conducting a microbiome study. *Cell.* 2014;158(2):250-62.
183. López-García A, Pineda-Quiroga C, Atxaerandio R, Pérez A, Hernández I, García-Rodríguez A, *et al.* Comparison of Mothur and QIIME for the analysis of rumen microbiota composition based on 16S rRNA amplicon sequences. *Front Microbiol.* 2018;9:3010.
184. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, *et al.* Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet.* 2012;13(1):47-58.
185. Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O' Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, *et al.* Comparing apples and oranges?: Next generation sequencing and Its impact on microbiome analysis. *PLoS One.* 2016;11(2).
186. Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, *et al.* Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 2015;6.
187. Thorell K, Bengtsson-Palme J, Liu OH-F, Palacios Gonzales RV, Nookaew I, Rabeneck L, *et al.* In vivo analysis of the viable microbiota and *Helicobacter pylori* transcriptome in gastric infection and early stages of carcinogenesis. *Infect Immun.* 2017;85(10).

La realización de esta tesis ha sido posible, en parte, gracias a una beca de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, concedida en 2015 con la finalidad de realizar una estancia en el laboratorio del Dr. Álex Mira en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (Fisabio).